



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS

# **Biología Celular y Molecular**

## MANUAL DE PRÁCTICAS 2017-2



***BIOLOGIA: PLAN DE ESTUDIOS 2008***

***Nombre del Profesor: Dr. Faustino Camarena Rosales***

## Tabla de contenido

|  |           |
|--|-----------|
| <b>PROPÓSITO GENERAL DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE .....</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO: .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>REGLAMENTO DE LABORATORIO.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>CONSIDERACIONES GENERALES .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>NORMAS DE TRABAJO .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>COMPORTAMIENTO.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>DISPOSICIONES DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, .....</b>                        | <b>6</b>  |
| <b>LIBRETA DE LABORATORIO.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>REPORTE DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>CRITERIOS PARA LA AUTO EVALUACIÓN EN EL DESARROLLO DE HABILIDADES PRÁCTICAS .....</b> | <b>11</b> |
| <b>CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DEL REPORTE DE PRÁCTICA DE LABORATORIO .....</b>         | <b>12</b> |
| <b>PRÁCTICA 1: INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>PRÁCTICA #2: MICROSCOPIA .....</b>  | <b>15</b> |
| USO DEL MICROSCOPIO .....  | 15        |
| USO DEL OBJETIVO DE INMERSIÓN .....  | 16        |
| ILUMINACIÓN KÖHELER .....  | 17        |
| <b>PROTOCOLO PARA ILUMINACIÓN KÖHELER .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>OBSERVACIÓN DE CÉLULAS .....</b>  | <b>18</b> |
| TINCIÓN SIMPLE. ....   | 19        |
| <b>TINCIÓN DE HEMATOXILINA- EOSINA (HE) .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS OBJETOS EN EL MICROSCOPIO .....</b>                      | <b>21</b> |
| <b>PRÁCTICA 3: OSMOSIS.....</b>  | <b>22</b> |
| 1. DEMOSTRACIÓN DE LA DIFUSIÓN .....   | 22        |
| 3. DEMOSTRACIÓN DE OSMOSIS CON UN HUEVO. ....  | 23        |
| 4. DEMOSTRACIÓN DE OSMOSIS CON BOLSA DE DIÁLISIS.....                                    | 23        |
| 5. DEMOSTRACIÓN DE OSMOSIS EN CÉLULAS.....   | 24        |
| <b>PRÁCTICA 4: TINCIÓN GRAM .....</b>  | <b>25</b> |
| TINCIÓN GRAM .....   | 25        |
| OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE BACTERIAS .....   | 26        |
| INFORME DE RESULTADOS .....  | 26        |
| <b>PRÁCTICA 5: TEJIDOS.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>OBSERVACIÓN DE PREPARACIONES FIJAS. ....</b>  | <b>27</b> |
| <b>OBSERVACIÓN DE CÉLULAS EN TEJIDOS VEGETALES.....</b>                                  | <b>27</b> |
| <b>PRÁCTICA 6: RESPIRACIÓN .....</b>   | <b>29</b> |
| FERMENTACIÓN (EXPERIMENTO 1): .....  | 30        |
| FERMENTACIÓN (EXPERIMENTO 2): .....  | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| EXPERIMENTO DE RESPIRACIÓN AEROBIA .....  | 31        |
| PROCEDIMIENTO DE TITULACIÓN PARA CO <sub>2</sub> .....  | 31        |
| RECOMENDACIONES PARA PLASMAR LOS RESULTADOS Y SU ANÁLISIS.....  | 32        |
| <b>PRÁCTICA 7: MITOCONDRIAS .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS .....</b>   | <b>33</b> |
| PROTOCOLO ALTERNATIVO .....   | 34        |
| RECOMENDACIONES PARA PLASMAR LOS RESULTADOS Y SU ANÁLISIS.....  | 35        |
| <b>PRÁCTICA 8: CLOROPLASTOS.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>PRIMERA PARTE: SEPARACIÓN Y OBSERVACIÓN DE PLÁSTIDOS .....</b>   | <b>36</b> |
| AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN DE CLOROPLASTOS.....   | 37        |
| OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA FRACCIÓN DE CLOROPLASTOS .....   | 37        |
| OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CLOROPLASTOS TRATADOS CON UREA .....  | 38        |
| OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CLOROPLASTOS TRATADOS CON DETERGENTE .....  | 38        |
| IDENTIFICACIÓN DE CROMOPLASTOS .....  | 38        |
| OBSERVACIÓN DE AMILOPLASTOS.....  | 39        |
| OBSERVACIÓN DE LEUCOPLASTOS.....  | 39        |
| RECOMENDACIONES PARA PLASMAR LOS RESULTADOS Y SU ANÁLISIS.....  | 40        |
| <b>PRÁCTICA 9: NÚCLEO .....</b>   | <b>41</b> |
| TINCIÓN CON ACETO/ORCEINA.....  | 41        |
| <b>PRÁCTICA 10: MITOSIS .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>PRIMERA PARTE: EXAMINANDO CÉLULAS DE LEVADURA .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>SEGUNDA PARTE: OBSERVACIÓN DE MITOSIS .....</b>  | <b>44</b> |
| <b>PRÁCTICA 11: MEIOSIS .....</b>   | <b>45</b> |
| OBSERVACIÓN DE ESPERMAS EN VIVO .....   | 45        |
| TINCIÓN WRIGHT .....  | 46        |
| OBSERVACIÓN DE LAMINILLAS.....  | 46        |
| OBSERVACIÓN DE LAMINILLAS.....  | 46        |
| <b>ACTIVIDAD COMPLEMENTARIA, BÁSICA PARA LAS PRÁCTICAS SIGUIENTES. USO DE LOS MICROPIPETEADORES AUTOMÁTICOS .....</b> | <b>47</b> |
| EJERCICIO A: .....  | 48        |
| EJERCICIO B: .....  | 48        |
| EJERCICIO C: .....  | 48        |
| EJERCICIO D: .....  | 48        |
| CON PIPETAS DE GRAN VOLUMEN (MAYOR DEL ML).....   | 49        |
| RECOMENDACIONES PARA PLASMAR LOS RESULTADOS Y SU ANÁLISIS.....  | 49        |
| <b>PRÁCTICA 12: TECNOLOGÍA DE ADN .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>GENERALIDADES DE LOS PROTOCOLOS.....</b>   | <b>50</b> |
| CONSERVACIÓN.....   | 50        |
| HOMOGENIZACIÓN .....  | 51        |
| DEGRADACIÓN Y ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS.....  | 51        |

|   |           |
|---|-----------|
| RESUSPENSIÓN Y CONSERVACIÓN .....                             | 52        |
| <b>MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.....</b>                      | <b>53</b> |
| EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE CLOROFORMO .....           | 53        |
| EXTRACCIÓN SALINA .....                                       | 53        |
| EXTRACCIÓN DE ADN CON CTAB.....                               | 54        |
| <b>PRÁCTICA 13: ELECTROFORESIS .....</b>                      | <b>55</b> |
| GENERALIDADES DE LA ELECTROFORESIS .....                      | 55        |
| DESCRIPCIÓN DE LA ELECTROFORESIS .....                        | 55        |
| CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA .....                           | 56        |
| CORRIENTE ELÉCTRICA .....                                     | 56        |
| AMORTIGUADOR .....  | 56        |
| MATRIZ .....  | 57        |
| OTROS REACTIVOS. ....   | 58        |
| CUANTIFICACIÓN DE ADN.....                                    | 59        |
| ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN POR VISUALIZACIÓN. .... | 59        |
| PREPARACIÓN AGAROSA EN HORNO DE MICROONDAS.....               | 60        |
| ELECTROFORESIS .....  | 60        |
| <b>PRÁCTICA 14 PCR .....</b>                                  | <b>61</b> |
| <b>GENERALIDADES DEL PCR .....</b>                            | <b>61</b> |
| MUESTRA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS .....                         | 61        |
| CONDICIONES QUÍMICAS DE LA REACCIÓN .....                     | 61        |
| CONDICIONES FÍSICAS.....                                      | 63        |
| OTROS CUIDADOS.....   | 64        |
| <b>PCR ESPECÍFICO.....</b>                                    | <b>65</b> |
| <b>PRÁCTICA 15 PRACTICA TEÓRICA DE SECUENCIACIÓN .....</b>    | <b>67</b> |
| <b>SECUENCIACIÓN.....</b>                                     | <b>67</b> |
| <b>SECUENCIACIÓN MASIVA .....</b>                             | <b>67</b> |
| <b>SECUENCIAS EN GENE BANK .....</b>                          | <b>68</b> |
| <b>BLAST .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....</b>                          | <b>71</b> |
| <b>COLORANTES .....</b>                                       | <b>71</b> |
| ACETOCARMÍN .....   | 71        |
| ACETO-ORCEÍNA .....   | 71        |
| AZUL DE METILENO .....  | 71        |
| CRISTAL VIOLETA: (TINCIÓN GRAM) .....                         | 71        |
| EOSINA .....  | 71        |
| HEMATOXILINA .....  | 72        |
| LUGOL: (TINCIÓN GRAM).....                                    | 72        |
| SAFRANINA: (TINCIÓN GRAM). ....                               | 72        |
| <b>REACTIVOS EN GENERAL.....</b>                              | <b>72</b> |
| AZUL DE BROMOFENOL.....                                       | 72        |
| AGAROSA 0.8% .....  | 72        |

|  |           |
|--|-----------|
| BROMURO DE ETIDIUM.....                              | 72        |
| PROTEINASA K .....                                   | 72        |
| SDS AL 20 %.....                                     | 73        |
| STE (SOLUCIÓN DE LISIS PARA EXTRACCIÓN DE ADN) ..... | 73        |
| TBE .....  | 73        |
| TE, PH 8.0.....                                      | 73        |
| TEK, PH 7.5.....                                     | 73        |
| TEK- SACAROSA (15%).....                             | 73        |
| <b>SOLUCIONES PARA TITULACIÓN .....</b>              | <b>74</b> |
| SOLUCIÓN A .....                                     | 74        |
| SOLUCIÓN B .....                                     | 74        |
| <b>LITERATURA.....</b>                               | <b>75</b> |

## PROPÓSITO GENERAL DE LA UNIDAD DE APRENDIZAJE

Las Ciencias Naturales constituyen disciplinas cuyo campo de estudio son los fenómenos físicos, químicos y biológicos que se dan en el medio natural; analizándolos bajo diferentes enfoques, para construir generalizaciones de manera racional que permitan explicar el comportamiento de los organismos en el marco de la evolución biológica.

En este contexto, el curso de biología celular y molecular, busca brindarles a los alumnos los fundamentos básicos para comprender y estudiar a la unidad básica de la vida, a la célula, desde el punto de vista funcional y estructural, así como su interacción con su ambiente. Por otro lado, involucra el desarrollo de habilidades prácticas para el estudio microscópico y bioquímico de algunos componentes celulares, como por ejemplo el ADN.

Otro de los aspectos relevantes es que se busca que el alumno integre los elementos básicos para su incorporación en los cursos avanzados de su formación profesional, así como en optativas vinculada al área de biología celular y molecular, considerando que el conocimiento a nivel celular resulta indispensable para comprender la estructura elemental de todos los individuos.

Los conocimientos y habilidades adquiridos le brindaran las herramientas para realizar investigación científica en el área, así como para poder preparar informes técnicos en el área, con responsabilidad y ética profesional.

En este contexto el manual del curso constituye un auxiliar y guía de las actividades prácticas y de laboratorio. El documento está organizado en dos partes, la descripción de la normatividad para el trabajo en el laboratorio y la guía de las actividades prácticas.

Las prácticas están divididas en una sesión de introducción al trabajo de laboratorio y 6 módulos para 15 prácticas, correspondientes a 48 horas de trabajo en laboratorio, de acuerdo a la siguiente tabla:

| Modulo | Competencia(s)   | Descripción   | Practicas  | Duración |
|--------|--|---|--|----------|
| 1      |  | Introducción al trabajo de laboratorio  | 1- Introducción  | 3        |
| 2      | Categorizar los métodos de estudio aplicados a la Biología y Fisiología Celular, para su tipificación, con base en la utilización practica de algunas de ellos, para su posterior aplicación en el trabajo profesional con responsabilidad | Identificación de células y sus estructuras   | 2- Microscopia<br>Tinción HE                           | 6        |
| 3      | Diferenciar las estrategias para el estudio de las cubiertas celulares, mediante el análisis de las técnicas básicas, para su utilización en laboratorio,  | Identificación de cubiertas celulares y sistema de membranas de células eucariontes | 3- Osmosis y difusión<br>4- Tinción Gram<br>5- Tejidos | 6        |

## Biología Celular y Molecular

|   |  |  |   |    |
|---|--|--|---|----|
|   | con actitud crítica.   |  | 6- Respiración                                      |    |
| 4 | Comparar los métodos utilizados para la identificación de organelos en tejidos multicelulares, con base en la utilización de técnicas básicas, para su posterior aplicación en el campo profesional, con disciplina y respeto. | Identificación de células eucariontes en tejidos orgánicos y separación mecánica de organelos y sistemas | 7- Mitocondrias<br>8- Plastos                       | 9  |
| 5 | Comparar las metodologías convencionales para la descripción de los estadios de la división celular, explorando las técnicas de microscopia en forma profesional   | Reconocimiento de estadios de la división celular  | 9- Corpúsculo de Barr<br>10- Mitosis<br>11- Meiosis | 6  |
| 6 | Valorar diferentes metodologías de la tecnología de ADN a nivel celular para ejemplificar su aplicación, con actitud profesional   | Metodología para los estudios en Biología Molecular  | 12-Extracción ADN<br>13- Electroforesis             | 12 |
| 7 | Aplicar técnicas de replicación artificial de ADN para analizar sus fases con actitud crítica y profesional  | Replicación artificial de ADN  | 14- PCR<br>15- Secuenciación                        | 6  |

Cada Practica se deberá reportar a más tardar una semana después de su realización.

## Introducción al laboratorio:

En el desarrollo de las prácticas se busca la familiarización metodológica con las técnicas básicas utilizadas en la Biología Celular y Molecular. Por seguridad para los usuarios, los materiales y equipos se mantendrán en el laboratorio.

La evaluación de las prácticas se realizará con los siguientes criterios

- Asistencia (menos del 80%, no tiene derecho a la evaluación ordinaria)
- Reporte individual de la práctica de laboratorio, para su entrega será requisito llevar a cada sesión la libreta de laboratorio.

-- y contestar en el reporte de la práctica las siguientes preguntas

¿Qué material y equipo aprendió a usar?

¿Genero datos experimentales?

¿Qué conocimientos son básicos en el tema?

¿Qué habilidades y destrezas son requeridas para obtener adecuados resultados?

Se enviará por la plataforma Blackboard.



## Reglamento de Laboratorio

### Consideraciones generales

El trabajo en los laboratorios relacionados con las áreas de Biología Molecular y Biotecnología, están asociados con diferentes tipos de riesgos, que los podemos categorizar en:

- Peligros para las personas que trabajan en el laboratorio.
- Peligros para la salud de otras personas, así como riesgos para el ambiente, producidos por las actividades que se realizan.
- Riesgos en el manejo de los materiales y equipos utilizados.

Por lo tanto, es necesario tener una serie de precauciones para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

### NORMAS DE TRABAJO

·Es Obligatorio

En el laboratorio utilizar en todo momento: bata y zapato cerrado. Para algunas actividades será obligatorio el uso de guantes.

Lavarse las manos antes y después del trabajo en el laboratorio.

Mantener limpia el área de trabajo y material que se utilice.

Sí utiliza equipos, materiales de uso delicado y reactivo, es responsabilidad del usuario leer manuales o consultar sobre su funcionamiento.

Muchos de los reactivos que se emplean son sensibles a la luz o temperatura y peligrosos para la salud humana (mutagénicos o carcinogénicos), por lo que se debe estudiar las fichas técnicas donde se señalan las propiedades químicas y físicas de los mismos, así como su manejo y los riesgos para la salud.

Cuidar los reactivos y las soluciones stock (concentradas), en su caso trabajar con alícuotas.

Respetar las bitácoras, los cronogramas de actividades y los registros de uso de los aparatos.

Notificar cualquier desperfecto del equipo e informar al responsable del laboratorio cuando los reactivos están por terminarse.

Mantener en buen estado los reactivos, soluciones y los espacios de trabajo asignados.

Todo el material deberá ser lavado con jabón, posteriormente enjuagarse con agua destilada.

Etiquete las muestras, reactivos y soluciones adecuadamente, indicando la siguiente información:

Muestras

Nombre del responsable y Fecha

Origen y detalle del contenido de la muestra

Soluciones

Nombre del responsable y Fecha

Nombre de la solución, indicando los componentes y la concentración

## Reactivos

Fecha en que se recibió y fecha de apertura

En caso de que pierda la etiqueta original, rotular el reactivo.

**DE LOS CONGELADORES Y REFRIGERADORES SE ELIMINARÁ TODO LO QUE NO CUMPLA LA REGLAMENTACIÓN**

Es responsabilidad de cada uno de los usuarios el disponer adecuadamente los desechos tóxicos, mediante la asignación de contenedores específicos. Por otro lado, es importante esterilizar el material biológicamente peligroso (bacterias modificadas, sustancias), antes de depositarlos en sus respectivos contenedores.

### **Está prohibido**

Sacar fuera del laboratorio, equipo y materiales (únicamente podrán salir con autorización del responsable del laboratorio).

El acceso a personas no autorizadas.

Comer y Fumar dentro del laboratorio.

Utilizar artículos personales (celulares, computadoras, etc.) con guantes.

El laboratorio es un lugar de trabajo, si es requerido platicar se recomienda ocupar los espacios externos al laboratorio.

En caso de duda contactar a la persona responsable del laboratorio.

**El trabajo operativo en estos laboratorios implica costos, tanto en tiempo como en recursos, por lo que se recomienda utilizar el sentido común en todas sus acciones.**

## **COMPORTAMIENTO**

En los laboratorios relacionados con la Biología Molecular y la Biotecnología, generalmente se comparten equipos y recursos, además de largos tiempos de compañía, por lo que también es importante considerar los aspectos relacionados con la actitud, particularmente la disposición al trabajo en equipo, el respeto a los colegas y el buen humor.

**DEJE FUERA DEL LABORATORIO TODO LO QUE SEAN CRITICAS DESTRUCTIVAS, ACTITUDES OFENSIVAS Y NEGATIVAS, ASI COMO EL LENGUAJE POCO PROFESIONAL.**

La limpieza y el orden en el espacio de trabajo auxilian para obtener buenos resultados al disminuir los riesgos de contaminación de los artículos que utilizamos y de nosotros mismos, además permiten un mejor ambiente de trabajo. Si hay orden en el laboratorio y en el espacio de trabajo, también lo hay en las ideas.

## Disposiciones del laboratorio de Biología Molecular,

La normatividad federal vigente en materia de seguridad, obliga a los usuarios del laboratorio seguir las siguientes recomendaciones:

1. Todas las gavetas deben de estar disponibles para cualquier inspección que se realice. Si alguien desea mantener sus reactivos o materiales bajo candado, deberá mantener disponible una copia de la llave con el encargado del laboratorio.
2. Todos los reactivos deben estar colocados en charolas de contención.
3. De todos los reactivos deberá estar disponible la hoja de seguridad, en español.
4. Los residuos del laboratorio quedan clasificados en las siguientes categorías:
  - a. Residuos biológico infecciosos
    - i. Punzo cortantes como navajas
    - ii. Guantes
    - iii. Desechos de disecciones o residuos animales y vegetales
    - iv. Desechos de cultivo microbiológicos
  - b. Residuos líquidos
    - i. Mezcla de solventes
    - ii. Contaminados con bromuro de etidio
  - c. Residuos sólidos contaminados con bromuro de etidio
  - d. Basura general
5. Los desechos se colocarán en recipientes específicos para su acumulación, posteriormente se pasarán al almacén general de la Facultad de Ciencias. En bitácoras específicas se anotarán las cantidades generadas.

### *a. Residuos biológico infecciosos*

#### *i. Punzo cortantes como navajas:*

1. Los desechos se colocarán en el bote rojo ubicado en la mesa del laboratorio
2. En la bitácora se anotará la cantidad aproximada que mensualmente deposite por responsable

#### *ii. Guantes (no contaminados con Bromuro de etidio):*

1. Los desechos se colocarán en el bote con bolsa roja ubicada al frente del laboratorio
2. En la bitácora el encargado del laboratorio anotará la cantidad aproximada que semanalmente se deposite
3. La bolsa roja no debe llenarse a más del 80 % de su capacidad. En caso de llenarse por favor cerrar y colocar la siguiente.
4. NO DEBEN DE TIRARSE GUANTES NO CONTAMINADOS EN NINGUN OTRO RECIPIENTE

#### *iii. Desechos de disecciones o residuos animales y vegetales*

1. El responsable de la generación del desecho determinara su mejor destino. Si corresponde a la bolsa roja (biológico infecciosos), favor de anotar en la bitácora.

## iv. Desechos de cultivo microbiológicos

1. El responsable de la generación del desecho determinara su mejor destino. Sí corresponde a la bolsa roja (biológico infecciosos), favor de anotar en la bitácora.

### *b. Residuos líquidos (no contaminados con bromuro de etidio)*

#### i. Mezcla de líquidos no contaminados con bromuro de etidio

1. Los desechos se colocarán temporalmente en los frascos cubiertos con papel aluminio que están sobre las mesas, después en el frasco de galón color ámbar, el cual esta etiquetado y ubicado en la gaveta debajo de la campana de extracción de vapores al final del laboratorio

2. En la bitácora se anotará la cantidad aproximada que mensualmente se deposite por responsable

#### ii. Contaminados con bromuro de etidio

1. Los desechos se colocarán temporalmente en el frasco de galón color ámbar, el cual esta etiquetado y ubicado en cuarto oscuro, en la gaveta debajo de la tarja

2. En la bitácora se anotará la cantidad aproximada que mensualmente se deposite por responsable

### *c. Residuos sólidos contaminados con bromuro de etidio*

#### i. Geles

1. Los desechos se colocarán en el bote etiquetado, ubicado en el cuarto oscuro

2. En la bitácora ubicada en el cajón superior del lado izquierdo, se anotará la cantidad aproximada que semanalmente se deposite

#### ii. Plásticos, papel y cartón

1. Los desechos se colocarán en el bote etiquetado, ubicado en el cuarto oscuro

2. En la bitácora ubicada en el cajón superior del lado izquierdo, se anotará la cantidad aproximada que semanalmente se deposite

### *d. Basura general.*

NO DEBERA CONTENER NINGUNO DE LOS RESIDUOS ANTES INDICADOS. El conserje asignado al laboratorio la recogerá periódicamente

## Libreta de Laboratorio

Toda la descripción del proceso que involucra la generación de datos en el laboratorio debe estar anotada en la libreta de laboratorio o bitácora. Es una herramienta obligada que garantiza la reproducción de los experimentos y respalda nuestra investigación al registrar las actividades e ideas, errores y aciertos.

PREVIO A CUALQUIER ACTIVIDAD PRACTICA, DEBE OBTENER INFORMACION TEORICA DEL TEMA Y ESCRIBIRLO EN LA LIBRETA

La libreta deberá ser de pasta dura, hojas enumeradas y cosidas (evite cuadernos engargolados). Toda anotación debe ser escrita con tinta.

La libreta deberá ser única; exclusivamente se usará en el laboratorio.

- Etiquete correctamente la libreta con sus datos personales, título del curso o proyecto, nombre del profesor o tutor.
- De preferencia dejar las dos primeras páginas como índice, la última página para incluir una tabla de abreviaturas y códigos utilizados. Las penúltimas páginas serán para anotar las fórmulas de los reactivos que se utilicen
- Anote todo lo que realice en laboratorio en forma cronológica, con información clara y entendible. Remarque sus resultados.
- Indique lo que sucedió en cada ocasión que trabaje en el laboratorio, incluyendo la información teórica, variaciones de los protocolos y la justificación correspondiente, evitando anotar datos en hojas sueltas.
- No utilice corrector, ni sobrescriba, en su caso cruce con una línea las palabras o frases escritas erróneamente.
- En cada página se recomienda anotar: título de la actividad o experimento, fecha, número de página y en lo posible los archivos electrónicos generados y asociados a los experimentos realizados.
- No arranque las hojas. No se admite la bitácora si no tiene continuidad en su enumeración.
- Anote todos los cálculos que realice.
- Cronológicamente, pegue las fotos, gráficas y otros documentos o comprobantes que se generen de su trabajo en el laboratorio.
- Resuma sus resultados, analícelos y contrástelos, finalmente sintetice sus conclusiones.

Anote el listado de todos los materiales y equipos utilizados y describa los métodos seguidos

Discuta las actividades realizadas, así como los resultados obtenidos, explicitando sus sugerencias

Sintetice sus conclusiones

## Reporte de Prácticas de laboratorio

Un reporte debe llenar dos objetivos. Primero, debe describir clara y completamente los procedimientos seguidos (en términos reproducibles) y los resultados hallados (en forma original y posteriormente con su análisis). Segundo, debe ubicar los resultados en perspectiva con el estado actual del conocimiento, interpretando su importancia. Las partes que contiene un reporte científico, son las siguientes:

### TITULO.

Nominación sintética de la investigación, la cual debe ser breve y concreta, enunciando el problema a resolver.

### INTRODUCCIÓN.

Presentación de la información base, que dentro del cuerpo de conocimiento nos ubica en el problema planteado, así como la información relacionada a su resolución. También se refiere a la importancia del trabajo, esto último puede tratarse en un punto separado.

### ANTECEDENTES.

Resumen de otras investigaciones similares o bien que fundamenten los aspectos metodológicos del trabajo.

### COMPETENCIA.

### MATERIALES Y MÉTODOS DE TRABAJO.

En forma sintética se explica la aplicación de los métodos, generalmente en forma referencial, así como la descripción de los materiales, de tal forma que el lector del trabajo, cuente con la información necesaria para poder repetir la experiencia, con base a lo descrito.

### RESULTADOS.

Presentación ordenada tanto los datos obtenidos sin procesamientos, así como la información procesada, con los resultados de los estadígrafos.

### DISCUSIÓN.

Corresponde a una disertación razonada del contraste de los resultados obtenidos contra los antecedentes bibliográficos (cuerpo de conocimiento existente), así como los puntos de vista fundamentados del autor. En esta sección se buscará obtener algunos de los siguientes puntos:

- 1) Analizar los resultados.
- 2) Compararlos con los de otros.
- 3) Identificar fuentes de error, sin llegar al extremo de invalidar el propio trabajo.
- 4) Especular acerca de los significados más amplios de las conclusiones obtenidas.
- 5) Identificar los siguientes pasos en la investigación del problema.
- 6) Sugerir mejoras.

### CONCLUSIONES.

En forma breve se presenta el cuerpo de conocimiento adquirido a partir de la investigación realizada, así como los más sobresalientes resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFÍA REFERIDA.

### SOLO OBRAS ARBITRADAS, COMO LIBROS O ARTICULOS CIENTÍFICOS.

Se cita en forma organizada y homogénea, tanto los libros, los artículos y en general las obras consultadas, que fue indispensable su indicación o referencia en el contenido del trabajo.

Considerando su valor utilitario, se describe a continuación en síntesis los procedimientos para citar material bibliográfico en el texto y en la sección final del reporte científico de literatura citada.

#### Como citar en el texto.

- Después de un párrafo donde se cite a un determinado autor, se anota entre paréntesis, ejemplo (Barnes, 1969).

- En el caso de que el nombre del autor forme parte del texto, el año se indica entre paréntesis, ejemplo Barnes (1969).

- Si se trata de más de un autor, se anota entre paréntesis después del primer autor la palabra *et al.*, que del latín significa "y otros", ejemplo (Barnes, *et al.*, 1969).

- En el caso de que un autor, sea consultado para más de una referencia de un mismo año, estas se anotan con una letra en orden, después del año, ejemplo (Barnes, 1969a), (Barnes, 1969b), etc. y en la sección de literatura citada se enlistan en orden cronológico.

#### Como indicar las referencias en la sección de literatura citada.

La literatura deberá anotarse en orden alfabético y en caso de que un autor contribuya con más de un trabajo en orden cronológico, siguiendo el mismo formato en toda la sección, se recomienda tener los siguientes datos:

1. Nombre del autor. Se indica apellido paterno (primer apellido) completo, inicial de segundo apellido, inicial de nombre.
2. Fecha de publicación.
3. Título de la obra. Se ponen mayúsculas en las letras iniciales.
4. Numero de edición. En el caso de la primer edición o edición única, no se indica.
5. País o en su caso ciudad de edición.
6. Casa editorial. Cuando la casa editorial es muy conocida, no es necesario poner la casa editorial.
7. Páginas referidas.
8. En el caso de artículos, la sustitución de los incisos anteriores 4 a 6, se indica el nombre de la revista (en caso de conocerse se utiliza la abreviatura convencional), Volumen y Número de la revista.

#### a) Referencia de un libro:

Barnes, R.P. 1969. Invertebrate Zoology. 2da. ed. Philadelphia. Ed. Saunders. 350-355 pp.

#### b) Referencia de una revista:

Hunter, P.A. y D.D. Keck. 1949. California Plant Communities. Aliso, 2 (1): 87-105.

## TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS.

Debido a que existen diversos criterios de ubicación de las presentaciones gráficas, especialmente cuando intervienen políticas editoriales, usualmente se presentan al final del trabajo,

aunque en el reporte de prácticas que no tiene que pasar por consideraciones editoriales, se recomienda intercalarlas de acuerdo al escrito.

## Criterios para la auto evaluación en el desarrollo de habilidades prácticas

| Criterios   | Descriptorios                                   |  |  |  |
|---|---|--|--|--|
| Criterio A<br>Habilidades en la utilización de material y equipo de laboratorio   | El estudiante no alcanza ningún nivel.<br><br>0 | El estudiante es capaz de reconocer la materia y equipo de laboratorio, pero desconoce o confunde su manipulación y es incapaz de obtener datos experimentales.<br><br>1   | El estudiante muestra conocimiento del material y equipo de laboratorio para el desarrollo de la actividad, pero comete errores de manipulación que provocan mala o incompleta recolección de los datos experimentales.<br><br>2                                 | El estudiante muestra conocimiento completo y manipulación de todo el material y equipo de laboratorio para el desarrollo de la actividad experimental sin ayuda del profesor, lo utilizo adecuado y correctamente en lo recolección de sus datos experimentales.<br><br>3     |
| Criterio B<br>Habilidad en el análisis de Datos                                   | El estudiante no alcanza ningún nivel.<br><br>0 | El estudiante emplea los datos experimentales para hacer el análisis de resultado, pero las relaciones con los objetivos de la actividad experimental son nulas.<br><br>1  | El estudiante emplea algunos de los datos experimentales para hacer el análisis de resultados, y poca relación con los objetivos de la actividad.<br><br>2   | El estudiante utiliza todos y cada uno de los datos experimentales para hacer el análisis de resultados relacionado a los objetivos de la actividad.<br><br>3  |
| Criterio C<br>Habilidades para el manejo del conocimiento y conceptos científicos | El estudiante no alcanza ningún nivel.<br><br>0 | El estudiante es capaz de recordar cierta información de los conceptos, pero NO es capaz de aplicarlos para explicar la actividad experimental, muestra cierta capacidad de seleccionar información, expresarla en sus propias palabras y utilizarla.<br><br>1 | El estudiante muestra buenos conocimientos y buena comprensión de los conceptos: puede aplicarlos para explicar algunas situaciones de la actividad experimental. Cierta grado de comprensión de la naturaleza de los fenómenos realizados es evidente.<br><br>2 | Demuestra buenos conocimientos globales y comprensión de los conceptos, puede aplicarlos en cada uno de las situaciones experimentales, es capaz de sintetizar y evaluar nuevas ideas y tiene una apreciación muy buena de la naturaleza de los fenómenos realizados.<br><br>3 |
| Criterio D<br>Habilidad en descubrir y obtener conclusiones                       | El estudiante no alcanza ningún nivel.<br><br>0 | El estudiante hace sólo una justificación sobre la realización del trabajo y sus dificultades.<br><br>1  | El estudiante incluye en la conclusión una justificación no relacionada con lo hipótesis, pero comenta sobre posibles fuentes de error y cumplimiento de los objetivos.<br><br>2   | Incluye en su conclusión la justificación de las hipótesis, posibles fuentes de error; comentario sobre el cumplimiento de los objetivos y hace sugerencias para mejorar el trabajo experimento.<br><br>3  |

**Criterios para la evaluación del reporte de práctica de laboratorio**

| Con base en calificación de 10 | Un punto por cada renglón   | Medio punto                              | Cero puntos por cada renglón   |
|--------------------------------|---|--|--|
| Titulo                         | Incluye el título que resume el problema a resolver con la practica   | -----                                    | Utiliza como título aspectos como <practica #>, copia el título del manual,... |
| Introducción                   | Presenta el marco de referencia teórico y la importancia del tema   | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Antecedentes                   | Resume al menos una investigación similar   | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Materiales                     | Presenta en un párrafo los principales materiales y equipos utilizados  | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Métodos                        | Describe en al menos un párrafo la metodología, siguiendo el ejemplo de un artículo científico                      | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Resultados                     | Presenta en forma ordenada los datos obtenidos sin procesamiento  | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Discusión                      | Contrasta los resultados obtenidos contra los antecedentes bibliográficos   | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Conclusión                     | Presenta en síntesis, el cuerpo de conocimiento adquirido a partir de la investigación realizada                    | Presenta en forma parcial la información | No presenta la sección o presenta otra información                             |
| Bibliografía                   | Sigue el formato recomendado, NO PAGINAS DE INTERNET  | -----                                    | No sigue el formato recomendado y/o cita PAGINAS DE INTERNET                   |
| Autoevaluación                 | Presenta su autoevaluación, con base en Criterios para la auto evaluación en el desarrollo de habilidades prácticas | =====                                    | No presenta su autoevaluación  |

## PRÁCTICA 1: Introducción

### INTRODUCCION:

Durante la primera sesión de laboratorio se busca promover la exploración rápida de los aspectos básicos para el trabajo en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias, considerando la normatividad, reglas de operación y sobre todo los cuidados que se deben tener.

En el trabajo de laboratorio se deben tener diversas consideraciones, incluyendo las dirigidas hacia contestar las preguntas ¿qué se trabaja?, ¿con qué se trabaja? y ¿quién trabaja? En nuestro caso la prioridad es la seguridad de los que trabajan, por lo que se deben tener en forma razonable el cuidado de usar bata, calzar zapatos cerrados y en el caso de tener el cabello largo, utilizar una estrategia para recogerlo, incluyendo el uso de ligas o redes. Eventualmente se utilizarán guantes.

En relación a lo que se trabaja, debemos tomar en cuenta los costos, así como la dificultad para obtener los materiales y los equipos. En este sentido se deben tener los cuidados pertinentes, tomando en cuenta que se utilizaran a lo largo del curso una amplia diversidad de materiales y equipos. Por ejemplo, en los materiales se utilizarán desde los que son inocuos para la salud humana o ambiental, hasta los que en cantidades traza pueden tener efectos mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos, o causar efectos ambientales importantes.

Otro aspecto a considerar es el tipo de laboratorio en donde se trabaja. Podemos tomar en cuenta la clasificación internacional de la seguridad, en la cual se clasifican los laboratorios desde el nivel P1 hasta el P4. En el primer nivel (p1), se sugiere mantener cerradas las puertas del laboratorio durante los experimentos, no se permiten comidas o bebidas, no se permite pipetear con la boca, se deben esterilizar los materiales y reactivos (cuando sea posible), particularmente los desechos, manteniendo el laboratorio y particularmente el espacio de trabajo limpio, lo cual se aplica a los laboratorios como los de botánica, zoolología o química utilizados en la FC-UABC.

El laboratorio de Biología Molecular lo podemos agrupar en el nivel P2, en donde son requisitos adicionales contar con armarios de seguridad, contenedores para desechos y productos biológicos, señalamientos de las precauciones. Incluyendo a) Desechos contaminados con Bromuro de etidio, b) Desechos contaminados con compuestos orgánicos (fenol), c) Desechos metálicos.

Los niveles P3 y P4 incluyen mayores cuidados, así como instalaciones más especializadas. En P3, se controla el acceso al laboratorio, entrada solo con vestimenta apropiada incluyendo overoles, gorras, botas, cubre bocas, se mantiene bajo presión negativa el laboratorio, reduciendo la salida de aire cuando se abren puertas, además se sellan ventanas, y aire se debe purificar el aire con filtros HEPA. Finalmente, en P4 se manejan patógenos que representan gran peligro para el operador y se debe manejar en cabina de bioseguridad nivel III.

Para el reporte de práctica se recomienda que con base en la presentación de la sesión de laboratorio realice una investigación del marco de referencia teórico de la sesión, así como responder las siguientes preguntas, con base en libros y artículos.

¿Cuáles son las principales recomendaciones para trabajar en laboratorios de Biología?

¿Cuáles son las características que diferencian a los laboratorios de zoolología, botánica, química y biología molecular?

### MATERIAL:

## BATA PARA LABORATORIO

### METODOLOGIA:

1. En forma teórica se revisarán aspectos generales del laboratorio, así como el reglamento y las recomendaciones para el manejo de los desechos. La información que se encuentra en el manual acerca del “reglamento de laboratorio”, “Normas der trabajo” y “disposiciones del laboratorio”, deberá resumirlos en esta sección.
2. Recorrido en el laboratorio, con el fin de identificar las diferentes áreas de trabajo, así como los principales equipos. Esquematice la distribución de las áreas del laboratorio e identifique los recipientes para desechos para cada sección del laboratorio.
3. Revisión del manejo de la libreta de laboratorio.

### Recomendaciones para la discusión.

1. Resuma la información teórica y contrástela con el marco de referencia que obtuvo.
2. Analice los cuidados que debe tener en cada área del laboratorio.
3. Prepare su libreta de laboratorio, contraste con la información que recomiendan diversos autores para llevar la libreta de laboratorio y explique su valor utilitario.
4. Procure emitir recomendaciones para mejorar los diferentes aspectos señalados en la sesión.

Recuerde que en la conclusión debe presentar en forma breve el cuerpo de conocimiento adquirido a partir de la sesión de laboratorio, así como los más sobresalientes resultados obtenidos.



E. Explosivo.



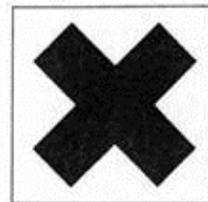
O. Comburente.



F. Fácilmente inflamable.  
F+. Extremadamente inflamable.



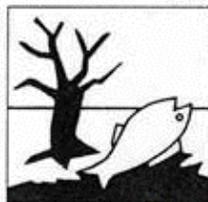
T. Tóxico.  
T+. Muy tóxico.



Xn. Nocivo.  
Xi. Irritante.



C. Corrosivo.



N. Peligroso para el medio ambiente.



R. Radiactivo.



I. Infeccioso.

## PRÁCTICA #2: Microscopia

### INTRODUCCION:

En una primera parte se busca promover la exploración rápida de algunas células eucariontes, como lo son las células sanguíneas, para lo cual se debe conocer el adecuado uso de los microscopios compuestos y el uso de la iluminación Köhler. En forma adicional se promoverá el desarrollo de habilidades asociadas a la tinción Hematoxilina-Eosina.

Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión y conteste las siguientes preguntas

¿Cuáles son los tipos de microscopio útiles en la actividad relacionada con la biología celular y molecular?

¿Cuáles son las principales características de los microscopios compuestos?

Copie un esquema de un microscopio compuesto

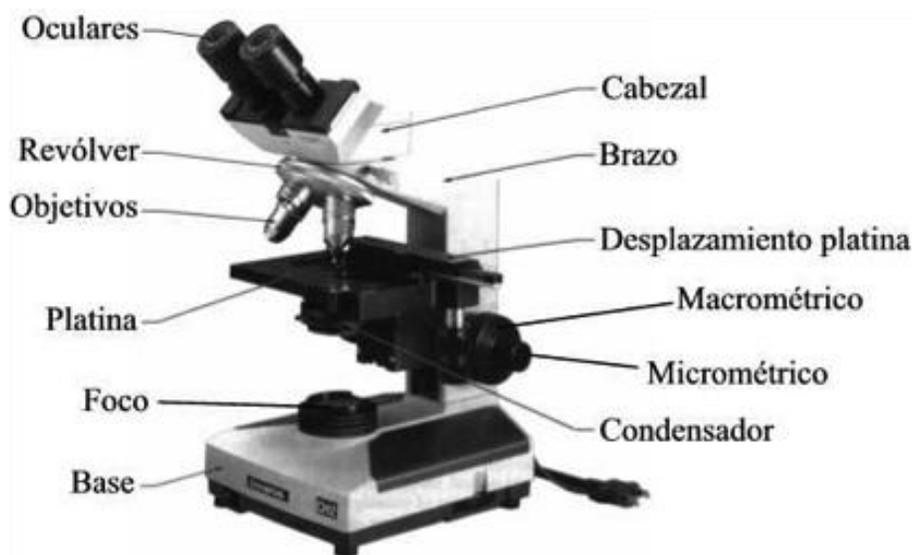
¿Cuáles son las principales recomendaciones para el uso del microscopio?

### Uso del microscopio

El microscopio es un instrumento delicado. Debido a esto debe recordar las siguientes instrucciones básicas:

- Coloque el microscopio en una posición cómoda sobre la mesa. Tómelo siempre del brazo. Si desea cambiar la posición del instrumento levántelo y **NO** lo arrastre por la mesa.
- Es conveniente verificar la limpieza de los lentes antes de comenzar a realizar observaciones.
- Encienda la lámpara, baje el condensador y abra el diafragma completamente. Recuerde, la observación se realiza más eficientemente con iluminación Köhler.

REPORTE EN EL ALMACEN DE MICROSCOPIOS CUALQUIER ANOMALIA



Realización de la observación

- a) Aleje el objetivo de la platina y coloque la lente de aumento menor (4x).
- b) Seleccione la preparación que desea observar, revísela para asegurarse que esta se encuentra limpia.
- c) Abra la pinza del carro, coloque la preparación con el cubreobjetos hacia arriba y cierre el carro.
- d) Ajuste la posición del carro de modo que la región a observar quede justo en el orificio de la platina.
- e) Usando el macro métrico acerque la lente a la preparación. Cuando logre un foco aproximado utilice el micrométrico (gírelo lentamente) para el ajuste de precisión.
- f) Si desea cambiar el aumento, gire el revólver y seleccione el nuevo objetivo a utilizar. Debiera bastar un pequeño ajuste del micrométrico para llegar a foco, si fuera necesario reajuste la iluminación usando el condensador.

Si requiere usar el lente de inmersión (100x en los microscopios de la FC) NUNCA lo use como objetivo seco, puede rayarlo.

## Uso del objetivo de inmersión

- a) La preparación debe estar enfocada a 40X (objetivo a seco), gire el revólver de modo que el objetivo de inmersión quede en una posición intermedia (40X y 100X).
- b) Coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubre objeto.
- c) Lleve el objetivo de inmersión al eje óptico.
- d) Utilizando el tornillo micrométrico lleve el objeto a foco, si lo requiere modifique la cantidad de luz del condensador.
- e) Cuando finalice la observación baje la platina, retire la preparación. Limpie tanto el objetivo como la preparación con papel para limpieza de microscopio. En casos especiales utilice papel seda humedecido con Xilol.

Al finalizar las observaciones el microscopio y las preparaciones deben quedar limpios. Gire el revólver y deje la lupa como lente de observación. Apague la lámpara y enrolle el cordón en el pie del microscopio.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Debe seguir una estructura, que puede variar según el observador, pero que debe ser sistemática y ordenada. Se sugiere que considere en sus observaciones el siguiente esquema:

- a) Objetivo: referido al porque se realiza la observación (Ej. observación de núcleo)
- b) Material: es el órgano o tejido del que se obtuvo la preparación (Ej. riñón de rata)
- c) Método: se refiere a la técnica histológica usada para elaborar la preparación (a fresco o permanente) y a la tinción utilizada. (Ejemplo Preparación a fresco de células)
- d) Aumento: la amplificación del objeto observado y depende del ocular y del objetivo.

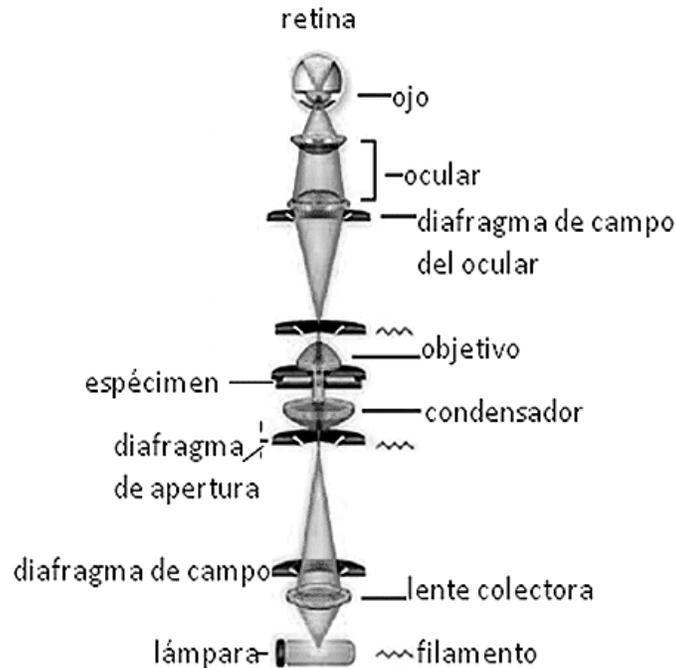
Aumento = aumento del objetivo x aumento del ocular

e) Observaciones: considere describir la forma celular; relación con otros elementos presentes, tamaño celular; forma, número y posición del núcleo y algunas características del citoplasma

f) Esquematice y coloree lo observado

## Iluminación Köheler

El Dr. Köheler, desarrolló un nuevo sistema de iluminación, que aún hoy en día se maneja y lleva su nombre, agregando un diafragma de campo luminoso posterior a la emisión de luz emitida por un bombillo de bajo poder, y centrando la mayor intensidad de luz exactamente cubriendo el diámetro de cada lente frontal de cada objetivo en su apertura numérica específica, para de esta manera, poder al 100% la luz emitida por la fuente emisora.



COMPETENCIA: Categorizar los métodos de estudio aplicados a la Biología y Fisiología Celular, para su tipificación, con base en la utilización practica de algunas de ellos, para su posterior aplicación en el trabajo profesional con responsabilidad.

### MATERIAL:

5 Portaobjetos y 5 cubreobjetos

Hematoxilina

Eosina

Alcohol etílico absoluto

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Disposición para obtener una gota de sangre

Un esquema, dibujo o foto con los tipos de células sanguíneas de humano

Microscopio compuesto para iluminación Köheler y papel para limpiar microscopio

Metodología:

## Protocolo para iluminación Köhler

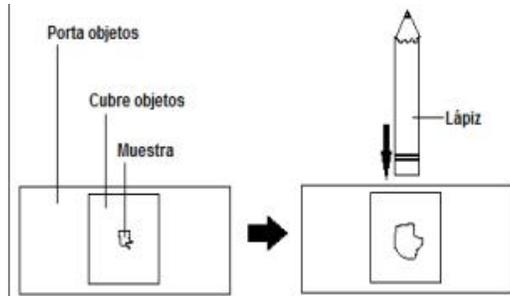
- 1.-Llevar el espécimen a foco utilizando el objetivo 10X.
- 2.-Cerrar completamente el diafragma del condensador.
- 3.-Cerrar completamente el diafragma de campo.
- 4.-Con el control de altura del condensador llevar el condensador hasta arriba5.-Bajar el condensador poco a poco hasta observar una figura geométrica (octágono) bien definida con el reborde ligeramente azulado.
- 6.-Con los tornillos de centrado del condensador colocar el octágono al centro del campo de observación.
- 7.-Abrir el diafragma de campo hasta que una de las aristas toque el borde del campo de observación y repetir el centrado hasta que todas las aristas toquen el borde del campo de observación al mismo tiempo.
- 8.-Cambie al objetivo 40X.
- 9.-Abrir el diafragma del condensador a la apertura numérica marcada por el objetivo.
- 10.-Observando con un solo ojo (derecho) mover el mando micrométrico hasta obtener el mejor punto de enfoque.
- 11.-Observando con el otro ojo (izquierdo) sin tocar el micrométrico gire la dioptría hasta obtener el mejor punto de enfoque.
- 12.- Cambie al objetivo 10X.
- 13.- Abrir el diafragma del condensador a la apertura numérica marcada por el objetivo.
- 14.- Sí el espécimen se mantiene en foco, los ajustes se hicieron correctamente, de lo contrario repita desde el punto 8 hasta lograr el correcto ajuste.

## Observación de células

1. Coloque la muestra sobre el portaobjetos y si es posible utilice el cubreobjetos.
2. Utilizando la iluminación Köhler y optimizando la iluminación, observe las células.
3. Incremente el aumento hasta 40X y 100x utilizando adecuadamente el aceite de inmersión.
4. Esquematice sus observaciones, indicando los datos de la muestra o la laminilla y técnica de tinción. En el caso de que utilice fotografías, con auxilio de un procesador de imágenes, muestre sus observaciones, delimite y nombre a las células y organelos o estructuras que observe

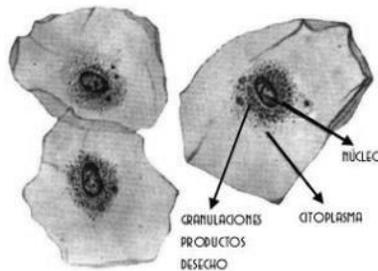
No se olvide utilizar ampliamente el sistema de iluminación, así como la profundidad de campo y el uso del micrómetro para el adecuado enfoque por cada campo.

En los casos en donde las muestras pueden quedar muy gruesas se realiza lo que se denomina “squash” (del verbo aplastar).



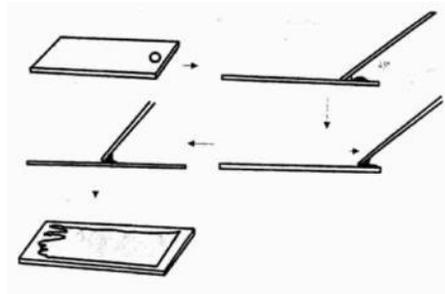
## Tinción simple.

1. Raspar suavemente con un palillo limpio la cara interna de la mejilla.
2. En un portaobjeto coloque unas dos o tres gotas de agua y enjuague el palillo, homogenizando y extendiendo las gotas sobre el portaobjetos.
3. Caliente sin que llegue a quemar el dorso de la mano con el portaobjetos.
4. Agregar unas gotas de azul de metileno, dejando actuar el colorante 2 o 3 minutos.
5. Elimine el colorante sobrante y lavando con agua hasta que no suelte color.
6. Utilizar un cubreobjetos colocándolo suavemente.



## Tinción de Hematoxilina- Eosina (HE)

1. Obtención una gota de sangre o muestra de células.
2. Realización del frotis sanguíneo. Se hace colocando una pequeña gota de sangre sobre un extremo del portaobjetos, con el lado de otro portaobjetos, en un movimiento uniforme, extiende la gota sobre el primero.



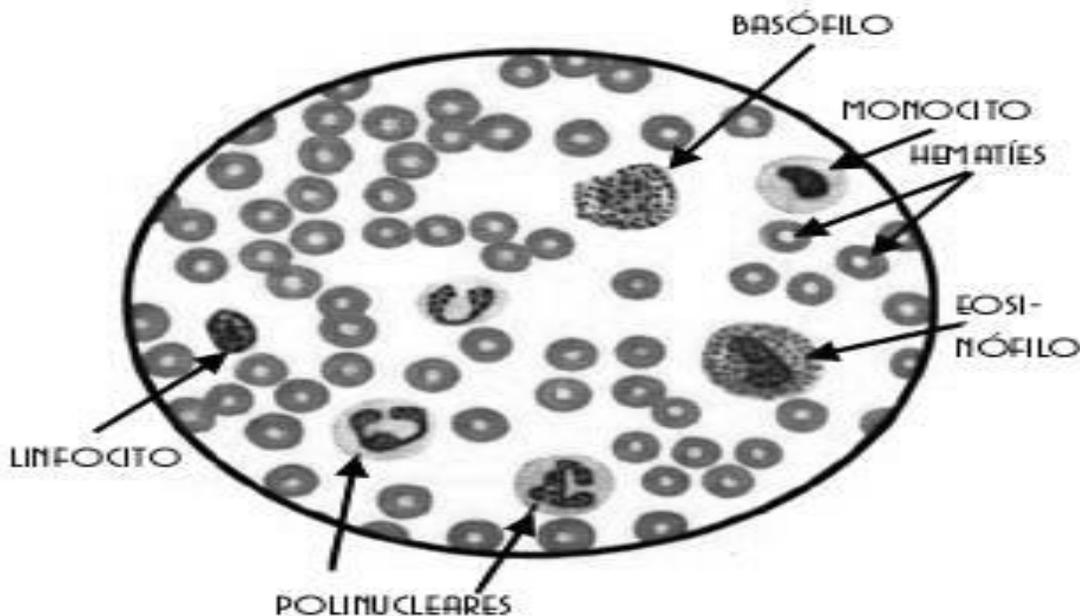
3. Secar el frotis al aire.
4. Fijar del frotis con alcohol absoluto (poner alcohol sobre la muestra hasta cubrirla totalmente, dejar que el alcohol se evapore totalmente).

5. Tinción con hematoxilina (agregar el colorante sobre la muestra hasta cubrirla totalmente, esperar exactamente 15 minutos, echando más colorante si éste se evaporara).
6. Lavar abundantemente con agua para que el colorante sobrante desaparezca y deje de actuar.
7. Tinción con eosina (poner el colorante sobre la muestra y dejar actuar durante 1 minuto exactamente).
8. Lavar abundantemente con agua para que el colorante sobrante se elimine y no siga actuando.
9. Secar al aire.
10. Observar al microscopio comenzando con pocos aumentos.

En la observación dominarán en el campo visual los glóbulos rojos, hematíes o eritrocitos, teñidos en color rojo que se caracterizan por carecer de núcleo y son más delgados por el centro que por los bordes.

Los glóbulos blancos (**leucocitos**) se identifican por la presencia de núcleo. Hay varias clases de glóbulos blancos:

- **Linfocitos** de mayor tamaño que los glóbulos rojos, con un notable núcleo que ocupa casi todo el citoplasma.
- **Monocitos** son los leucocitos grandes, poco frecuentes. Tienen un núcleo muy grande y redondeado que aparece teñido en color violeta.
- **Polinucleares** presentan el núcleo fragmentado.
- **Eosinófilos**, con granulaciones abundantes de color rojizo y el núcleo teñido de color azul marino. Estos glóbulos aumentan su número en caso de parasitosis o procesos alérgicos.
- **Basófilos** presentan un núcleo teñido de rojo y las granulaciones del citoplasma de color muy oscuro.



## Estimación del tamaño de los objetos en el microscopio

Con el microscopio se puede ampliar un objeto dependiendo de la capacidad de los objetivos y oculares, de tal forma que, si se tiene un ocular de 10X y el objetivo de 4X, entonces se aumenta el tamaño del objeto 40 veces. En los microscopios de la FC- UABC se pueden obtener hasta de 10X por 100X, es decir 1,000 aumentos.

Tomemos en cuenta que con la vista humana promedio sólo puede tener resolución (es decir la capacidad de discriminar dos puntos separados) por más de 0,1 mm o 100 micrómetros ( $\mu\text{m}$  o mm). La mayoría de las células son más pequeñas, por lo que se necesita utilizar microscopio óptico para realizar las observaciones, considerando su límite de resolución de 0,2  $\mu\text{m}$  o mm (200 nm).



Una forma rápida de estimar el tamaño del campo de observación es el uso de células de fácil obtención y de tamaño estándar, como son los glóbulos rojos, los cuales miden de 5 a 7,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de 1  $\mu\text{m}$  de grosor.



Otra forma rápida consiste en el uso de papel milimétrico, el cual se coloca en el portaobjetos y una vez que se enfoca adecuadamente, con cada objetivo, se puede utilizar como referencia para las sucesivas mediciones.

## PRÁCTICA 3: Osmosis

### INTRODUCCION:

En la sesión se busca promover la exploración rápida de algunas características del sistema de membranas, como lo es el transporte pasivo (difusión y osmosis). Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Competencia: Diferenciar las estrategias para el estudio de las cubiertas celulares, mediante el análisis de las técnicas básicas, para su utilización en laboratorio, con actitud crítica.

### MATERIAL:

Vasos de precipitado o recipientes

Pipeteador

Pipetas de 10 y 5 mL

Estuche de disección

Cuchillo

Portaobjetos y cubreobjetos

Aproximadamente 100 gr de azúcar

Aproximadamente 100 gr de sal

1 zanahoria

2 huevos frescos

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Un huevo, un trozo de zanahoria, un pedazo de papa, un trozo del tallo de una planta

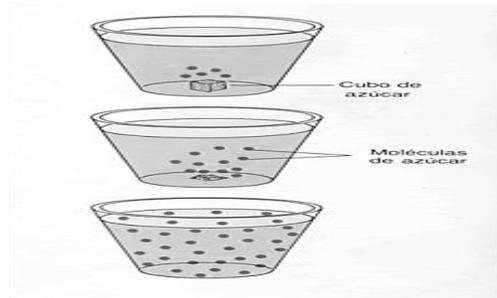
Disposición para obtener una gota de sangre

Microscopio compuesto para iluminación Köheler y papel para limpiar microscopio

### Metodología:

#### 1. Demostración de la difusión

- a. Coloque agua destilada en un recipiente (mida el volumen)
- b. Agregue 5 gotas de azul de metileno
- c. Describa lo que sucede cada 15 minutos



## 2. Demostración de osmosis, prueba A, en zanahoria

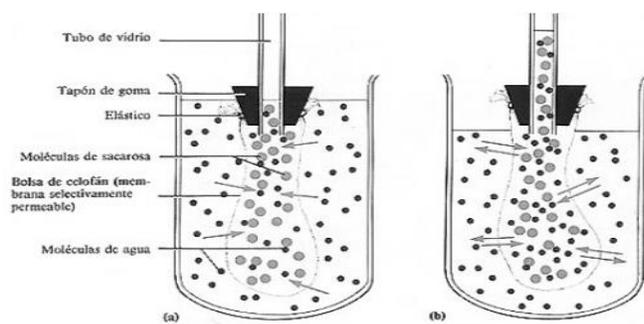
- Corte un trozo de la zanahoria
- Horade de tal forma que se forme un recipiente.
- Llene la cavidad con azúcar o sal
- Coloque el trozo en un recipiente con agua, de tal forma que la parte externa este en contacto con líquido
- Describa lo que sucede después de 2 horas

## 3. Demostración de osmosis con un huevo.

- Rompa con sumo cuidado la cáscara de un huevo, en el extremo más cónico, dejando una pequeña perforación.
- Por el otro extremo del huevo rompa la cáscara, sin dañar la membrana
- Llene la cavidad con agua destilada
- Coloque el huevo de tal forma que la parte externa este en contacto con líquido híper-salino o híper azucarado
- Describa lo que sucede después de 2 horas

## 4. Demostración de osmosis con bolsa de diálisis

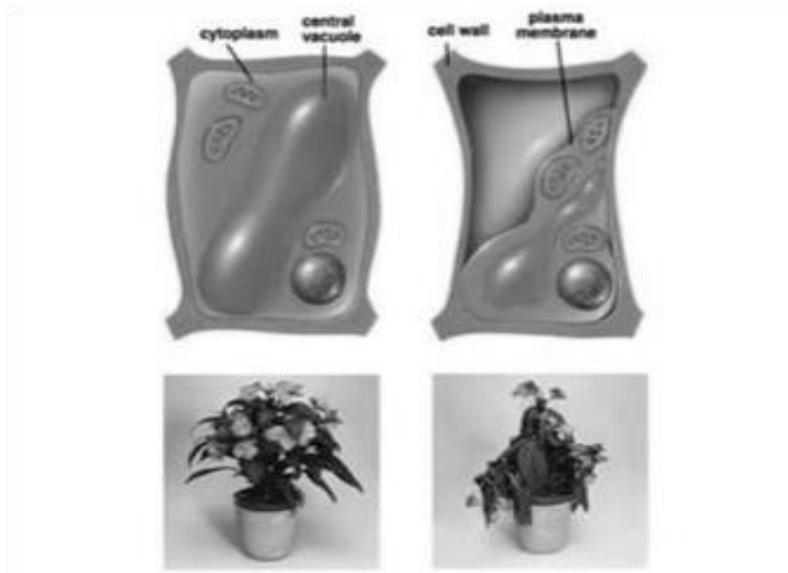
- Cierre uno de los extremos de un tubo de diálisis, amarrando fuertemente un hilo.
- Llene el interior con una determinada concentración de sal o azúcar
- Colóquelo de tal forma que la parte externa este en contacto con líquido que contenga una diferente concentración.



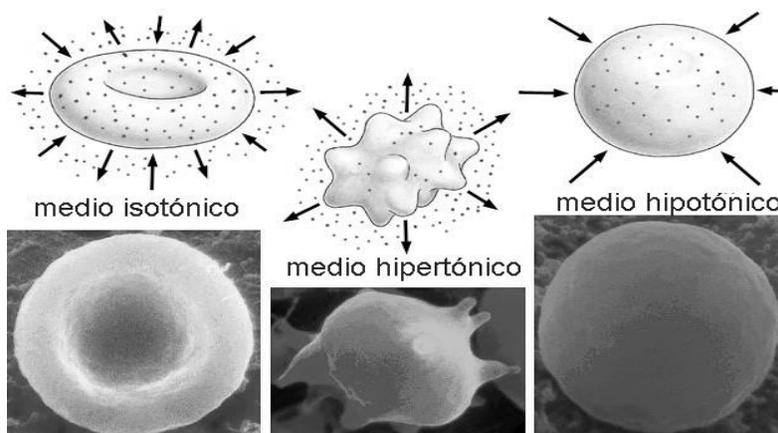
## 5. Demostración de osmosis en células

a. Vegetales a escala macroscópica. Coloque un trozo de tejido vegetal en diferentes concentraciones de sal o azúcar y anote las características del tejido cada 30 minutos

b. Células vegetales a escala microscópica. Coloque tres finos tejidos (como el de la cebolla) en portaobjetos. Agregue a cada gota de un líquido con una diferente concentración de sal o azúcar y observe al microscopio. Esquematice sus observaciones.



c. Células animales a escala microscópica. Coloque tres gotas de sangre en portaobjetos. Agregue a cada gota de un líquido con una diferente concentración de sal o azúcar y observe al microscopio. Esquematice sus observaciones.



Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

En cada inciso se realizan recomendaciones para plasmar resultados. Analice los resultados con respecto a lo esperado de acuerdo a la bibliografía.

## PRÁCTICA 4: Tinción Gram

### INTRODUCCION:

En la sesión se busca promover el uso de técnicas de tinción para la exploración y caracterización de las paredes celulares, en este caso de procariontes, con la técnica de tinción Gram. Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Competencia: Diferenciar las estrategias para el estudio de las cubiertas celulares, mediante el análisis de las técnicas básicas, para su utilización en laboratorio, con actitud crítica.

### MATERIAL:

Pipeteador

Pinzas

Palillos

Portaobjetos y cubreobjetos

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Muestras en las que evidentemente existan bacterias, como por ejemplo yogurt, muestra de pus, nódulos de gramíneas, esputo.

*Rhizobium leguminosarum*: Nódulos de leguminosas: trébol, soya, alfalfa. Gram negativas

*Acetobacter aceti*: Telita que se forma sobre el vinagre. Gram negativa.

*Lactobacillus vulgaris*: Yogurt. Gram positiva

Microscopio compuesto para iluminación Köheler y papel para limpiar microscopio

### Metodología:

#### Tinción Gram

1. Coloque la muestra sobre el portaobjetos y distribúyala realizando un frotis.
2. Fije la muestra por secado, pasándolo sobre un mechero. El paso del portaobjetos sobre la llama del mechero debe ser rápido, repita hasta que esta seca la muestra. La temperatura del portaobjetos debe ser la que soporta el dorso de la mano sin quemarla
2. Coloque unas gotas del colorante violeta de genciana, cubriendo la extensión; el tiempo de actuación del colorante es de dos minutos.
3. Lave con agua destilada para arrastrar el colorante.
4. Ponga solución de lugol durante un minuto.
5. Lave nuevamente con agua destilada.
6. Decolore con unas gotas de alcohol de 96°, que debe actuar de 30 segundos a un minuto, para arrastrar el colorante que queda libre.
7. Lave cuidadosamente con agua destilada.
8. Agregue unas gotas de safranina durante un minuto.

9. Lave con agua destilada.

10. Seque al aire.

11. Agregue aceite de inmersión y observe a 100X.

12. Utilizando la iluminación Köhler y optimizando la iluminación, observe las células. No se olvide utilizar ampliamente el sistema de iluminación, así como los campos de poca y gran profundidad, así como el uso del micrómetro para el adecuado enfoque por cada campo.

13. Esquematice sus observaciones.

Las bacterias Gram positivas aparecen en visión microscópica teñidas de un color morado intenso, por la violeta de genciana.

Las bacterias Gram negativas, aparecen en visión microscópica teñidas de un color rosado débil, por la safranina.

## Obtención de muestras de bacterias

a) Se arranca del suelo una planta de leguminosa con sus raíces. En las raicillas finas se verán unos nódulos en forma de pequeñas verrugas. Con las pinzas se desprende un nódulo. Se lava para quitarle la arena. El nódulo se parte con el bisturí sobre un portaobjetos agregando una gota de agua. Se quitan los residuos del nódulo, secando la preparación a la llama del mechero, se coloca el portaobjetos en el soporte de tinciones y se tiñe según la técnica de Gram.

b) Con la aguja de disección se toma una pequeña porción de yogurt. Se disuelve en una gota de agua y se hace una extensión sobre el portaobjetos. Se lava la preparación, dejando caer con un cuentagotas unas gotas de la mezcla alcohol-cloroformo para arrastrar las gotas de grasa del yogurt y se deja secar al aire. El portaobjetos se coloca en el soporte de tinciones y se tiñe según la técnica de Gram.

c) Disuelva en una gota de agua sobre un portaobjetos, una pequeña porción de sarro dentario tomada con la aguja y con esto se hace una extensión o frotis que se seca a la llama del mechero. Se coloca el portaobjetos en el soporte de tinciones y se tiñe según la técnica de Gram.

## Informe de resultados

Los resultados de una tinción de Gram se reportan como sigue:

- Forma bacteriana

- Coloración

- Agrupación bacteriana (escasa, media, abundante)

- En muestras de esputo, excretas, saliva o "pus" se considera la respuesta leucocitaria y su tipo (polimorfonuclear o monocitos) así como el conteo de células epiteliales a 10X.

La flora bacteriana observada por tinción de Gram se informa por género, forma o agrupación, pero nunca por especie, ya que la identificación solo se puede lograr mediante pruebas bioquímicas

## PRÁCTICA 5: Tejidos

### INTRODUCCION:

En la sesión se busca presentar el uso de técnicas de tinción histológicas aplicado a laminillas ya preparadas, para la exploración y caracterización de las células en tejidos. Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Para la realización de esta parte de la práctica, se tendrán disponibles diversas laminillas, preparadas en el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias, las cuales principalmente corresponderán a tejido epitelial teñido con la técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Competencia: Diferenciar las estrategias para el estudio de las cubiertas celulares, mediante el análisis de las técnicas básicas, para su utilización en laboratorio, con actitud crítica.

### MATERIAL:

Preparaciones fijas

Pinzas

Palillos

Portaobjetos y cubreobjetos

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Microscopio compuesto para iluminación Köhler y papel para limpiar microscopio

Libro de histología o en donde se muestren tejidos animales y vegetales

### Metodología:

### Observación de preparaciones fijas.

Para cada una de las laminillas.

1. Observe el tejido utilizando los menores aumentos, hasta localizar zonas donde se puedan identificar claramente a las células.
2. Incremente el aumento hasta 100x.
3. Utilizando la iluminación Köhler y optimizando la iluminación, observe las células, procurando identificar organelos internos, especialmente del sistema de membranas.
4. Esquematice sus observaciones, indicando los datos de la laminilla y técnica de tinción.

No se olvide utilizar ampliamente el sistema de iluminación, así como los campos de poca y gran profundidad, así como el uso del micrómetro para el adecuado enfoque por cada campo.

### Observación de células en tejidos vegetales.

Puede utilizarse un tallo o pedúnculo floral de una planta monocotiledónea.

En el tallo se realizan cortes con una navaja de un solo filo procurando obtener cortes muy finos, casi transparentes. Los cortes se van tomando con un pincel y depositándolos en una caja Petri con agua.

Los cortes más finos deben seleccionarse y se cubre la muestra con el colorante verde brillante durante un minuto.

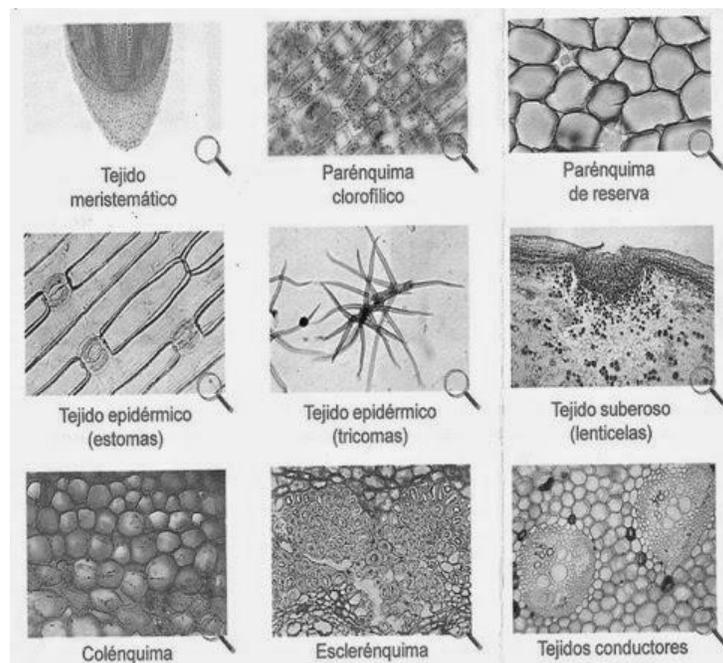
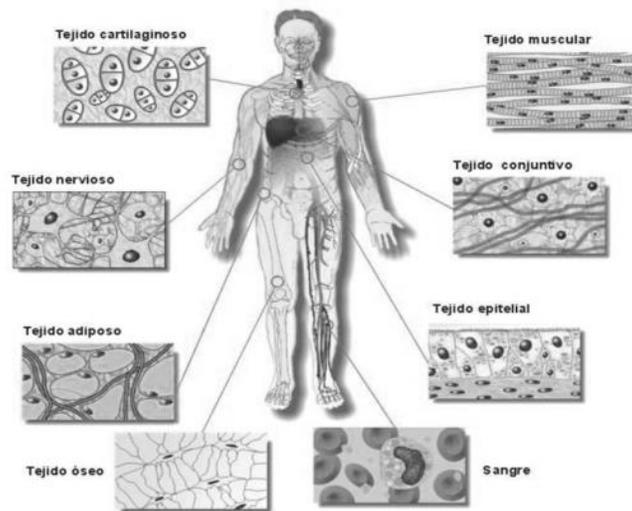
Posteriormente se lava con agua destilada, después con alcohol al 70% y finalmente con agua, cuidando el corte con una aguja de disección.

El corte se monta con una gota de glicerina en el portaobjetos y se coloca con cuidado el cubreobjetos.

La preparación debe ser observada, primero con pocos aumentos, haciendo un recorrido desde la corteza a la zona interna para que se logre obtener una visión general de la preparación.

En la preparación es posible observar las siguientes capas:

- Epidermis, formada por una capa de células, en la que se puede observar estomas teñidos de verde brillante.
- El parénquima cortical, formado por varias capas de células.
- El parénquima medular, células con membrana celulósica.



## PRÁCTICA 6: Respiración

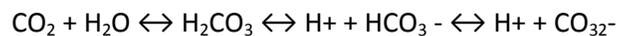
### INTRODUCCION:

En la sesión se busca reflexionar acerca de los procesos de respiración. Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Por un lado, se busca se desarrollen experimentos relacionados con la glucólisis y en forma complementaria estrategias para medir la respiración con base en la producción de dióxido de carbono en organismos acuáticos.

Para la medición del dióxido de carbono se basa en un método de titulación. Cuando el dióxido de carbono se disuelve en el agua, en gran parte reacciona con las moléculas de agua para formar ácido carbónico. El ácido carbónico es un ácido débil, sin embargo, reduce el pH del agua del lago. El nivel en la atmósfera y el disuelto en el agua con el tiempo llegan a un equilibrio, donde el CO<sub>2</sub> atmosférico se disuelve en el agua tan rápido como el CO<sub>2</sub> disuelto se escapa. Cuando se alcanza el equilibrio, la concentración de CO<sub>2</sub> dejaría de cambiar. En realidad, sin embargo, hay otros factores como la respiración, la fotosíntesis, procesos de oxidación o incluso la contaminación, por lo que los niveles de CO<sub>2</sub> disuelto usualmente no están en equilibrio.

El dióxido de carbono disuelto en agua llega al equilibrio carbónico en el agua conforme la siguiente ecuación:



El proceso de titulación lo entendemos en el cual una solución se le añade a otra solución de manera que reaccione bajo unas condiciones específicas para que el volumen añadido pueda ser medido con precisión. La titulación se asocia comúnmente con reacciones de ácido-base, pero se puede usar en otros tipos de reacciones.

En nuestro caso el CO<sub>2</sub> que producen estos organismos durante la respiración celular se convierte en un ácido (ácido carbónico: CO<sub>3</sub>), cuya concentración se medirá por medio de una titulación usando un indicador de pH (fenolftaleína).

El cambio en pH, se observará cuando donde se obtiene el equilibrio entre pH ácido y básico. Este cambio en pH sucede al añadirle una solución básica de NaOH a la muestra ácida, y se observa por un cambio en color; de esta forma se podrá calcular la producción de CO<sub>2</sub> para los organismos.

Competencia: Comparar los métodos utilizados para la identificación de organelos en tejidos multicelulares, con base en la utilización de técnicas básicas, para su posterior aplicación en el campo profesional, con disciplina y respeto.

### MATERIAL:

Tubos de ensayo

Gradillas

Tapón mono horadado

Recipientes para contener a los organismos

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Para los experimentos se requiere contar con varios peces de acuario y vegetales acuáticos.

Por equipo de 3 o 4 personas

1 bureta de 25 ml

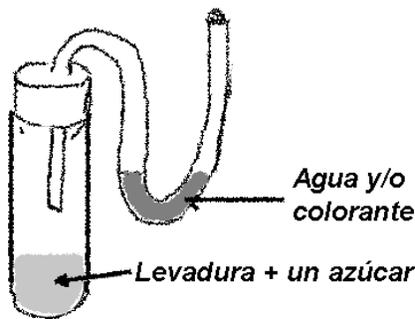
1 soporte universal

4 matraces de 150 ml

Metodología:

## Fermentación (experimento 1):

1.- Prepare el dispositivo para observar el proceso de fermentación.



3.- En un recipiente mezcle 20 ml de agua con medio gramo de un tipo de azúcar. Agregue medio gramo de levadura deshidratada.

4.- Con cuidado llene el tubo de ensayo y tápelo con el tapón con el tubo de vidrio en forma de "S" con la mezcla preparada. En el caso de que hubiera quedado algo de aire, marque hasta donde llega el líquido en el tubo. Mida el tiempo de reacción.

5.- Mantenga en posición vertical los extremos del tubo, preferentemente a 37°C.

6.- Prepare al menos otros tres tipos de azúcares. Mida el tiempo de reacción.

7.- Utilice el azúcar comercial como control positivo. Prepare un control negativo. Mida el tiempo de reacción del control positivo.

6.- Mantenga cada una de las reacciones al menos por 30 minutos.

Anote cualquier cambio que observe en la mezcla.

El gas producido se acumulará en el extremo cerrado del tubo "S". Registre el nivel del gas cada cinco minutos por alrededor de 30 min. Observe cualquier cambio en la mezcla. Anote los datos en una tabla.

## Fermentación (experimento 2):

- 1.- En el vaso de vidrio se disuelve una cucharada de azúcar en el agua previamente calentada a unos 37°C.
- 2.- Adicionalmente se agrega una cucharada de levadura y se homogeniza.
- 3.- La mezcla de la levadura se coloca en una en la bolsita plástica y se cierra bien, cuidando de no dejar nada de aire dentro de la bolsa.
- 4.- Describa lo que ocurre después de 15 minutos...

## Experimento de respiración aerobia

- 1.- Seleccione una muestra de peces (1 o 2). Estime el volumen de los organismos, utilizando una probeta de 100 ml
- 2.- Seleccione una muestra de vegetales acuáticos (1 o 2), considere un utilizar un volumen parecido al que ocupen los peces. Estime el volumen de los organismos, utilizando una probeta de 100 ml
- 3.- A los recipientes de la prueba agregue un volumen conocido (aproximadamente 200 ml). En un recipiente agregue los peces, en un segundo los vegetales y en un tercero solo un volumen equivalente de agua. Mida la concentración del dióxido de carbono en una muestra de agua homologa a la utilizada inicialmente. Tape todos los recipientes con un pedazo de parafilm o papel aluminio.
- 4.- Después de al menos una hora y media, transfiera 100 ml de líquido del primer recipiente en un matraz y realice la titulación correspondiente.
- 5.- Repita el procedimiento para los otros recipientes.
- 6.- Determine la concentración del dióxido de carbono en cada recipiente y compárelo con la primera valoración.

## Procedimiento de titulación para CO<sub>2</sub>

- 1.- Tome 100 ml de la muestra y añada 20 gotas de la solución A.
- 2.- Agregue gota a gota (con una bureta) la solución B agitando ligeramente después de cada gota.
- 3.- Si existe dióxido de carbono libre en la muestra, el color rojizo que toma por la adición del hidróxido de sodio desaparece otra vez.
- 4.- Continúe añadiendo la solución B hasta que la coloración rojiza persista en toda la muestra al menos durante 3 min, teniendo un fondo blanco y mirando desde arriba.

Cálculos

$$\text{mg CO}_2/\text{L} = \text{mL de NaOH gastados} \times 22$$

Solución A. Solución alcohólica de fenolftaleína al 0.1 %: 0.1 g de fenolftaleína se aforan a 100 ml con alcohol isopropílico al 96 %.

Solución B. Solución de hidróxido de sodio 0.05 N: 2.03 g de hidróxido de sodio se aforan a 1000 ml con agua destilada.

El método se describe con base en los protocolos de la NOM NMX-AA-073-SCFI-2001. ANÁLISIS DE AGUA - DETERMINACIÓN DE CLORUROS TOTALES EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA y de Franco López J et al. 2011. Ecología y conservación, Laboratorio y campo. 1ª ed. Ed. Trillas. México. 266 pp.

### Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describa en cada protocolo lo que sucede en cada paso.

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la práctica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

¿Las levaduras son procariontas o eucariotas?

¿En qué partes de la célula de levadura ocurre la glucólisis?

¿El tipo de carbohidrato fermentado afecta la tasa formación de gas?

¿Qué tipo de carbohidrato sustentó la tasa más rápida de fermentación?

¿Qué molécula es desdoblada en la reacción que produce el CO<sub>2</sub>?

¿Por qué es ventajoso para un organismo realizar fermentación?

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

## PRÁCTICA 7: Mitocondrias

### INTRODUCCION:

En la sesión se busca promover el desarrollo de habilidades para la separación de mitocondrias y su observación. Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Competencia: Comparar los métodos utilizados para la identificación de organelos en tejidos multicelulares, con base en la utilización de técnicas básicas, para su posterior aplicación en el campo profesional, con disciplina y respeto.

### Materiales y equipos

Tubos eppendorf

Tubos de centrífuga

Homogeneizador

Amortiguador STE y TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%)

Sacarosa

Centrífuga eppendorf

Centrífuga refrigerada

Mini fuga

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Al menos 1 gramo de tejido animal fresco, rico en mitocondrias

Por cada 4 estudiantes 1 microscopio compuesto y papel para limpiar microscopio

### Metodología:

### Extracción de mitocondrias

Extracción de mitocondrias a partir de tejidos ricos en mitocondrias, utilizando al menos de 3 a 5 gr. de tejido rico en mitocondrias, preferentemente de hígado, cerebro o gónadas maduras.

1. Con un homogeneizador de aspas o vidrio, se homogeneiza el tejido (3 a 5 gr., rico en mitocondrias) en dos volúmenes de TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%). Durante el homogeneizado mantenga la muestra en hielo y evite la formación de espuma (característica de un exceso de molido y la liberación de un exceso de enzimas).
2. Centrifugue a 200 xg, por 5 min. a 4 C. Descarte el precipitado.
3. Subyaciendo (es decir desde la parte de abajo), agregue lentamente un volumen de TEK-15% sacarosa.

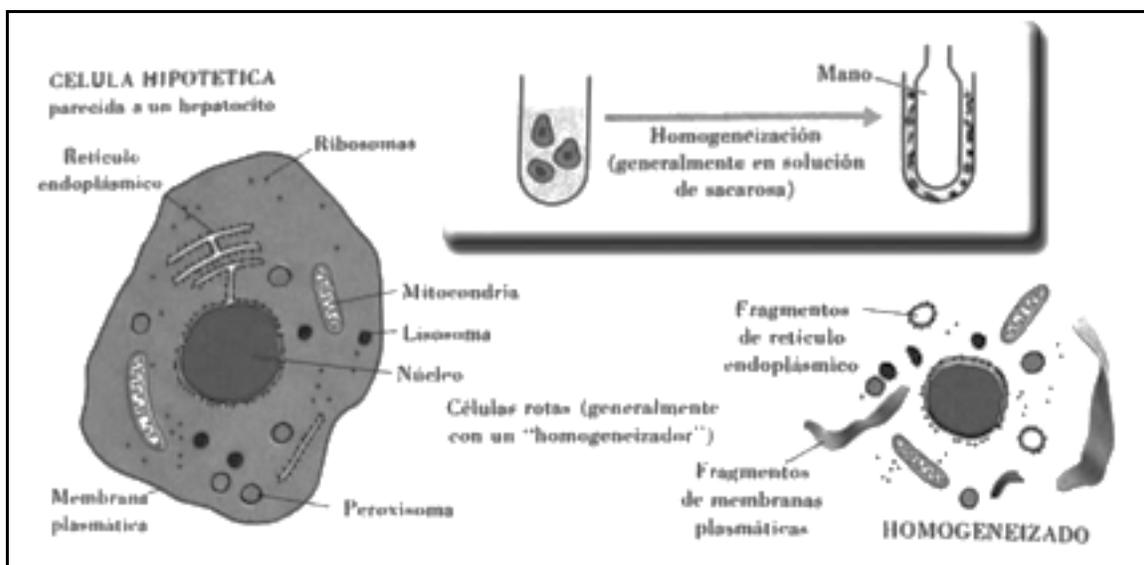
4. Centrifugue (10,000 xg por 10 min. a 4°C) y obtenga el precipitado (oscuro- núcleos) y el sobrenadante (claro- mitocondrias), en la interface entre el TEK y el TEK-sacarosa se concentran las mitocondrias.

5. Para concentrar el precipitado del sobrenadante claro, agregue al menos uno o dos volúmenes de TEK, centrifugue a 14,000 xg durante 15 minutos a 4 ° C y del producto de la centrifugación elimine el sobrenadante por decantación.

Nota: Tome en cuenta que, para concentrar las fases obtenidas en el paso cuatro, se debe diluir TEK-sacarosa arrastrado en la separación, con al menos dos volúmenes de TEK, esto para cambiar la densidad de la solución y se puedan precipitar fácilmente las mitocondrias o los núcleos con la centrifugación.

6. Puede realizar las observaciones o resuspenda el precipitado con TEK (mitocondrias en 0.9 ml por cada 5 gr. de tejido inicial), para conservar en el ultracongelador, correctamente etiquetado.

8. Para observar los organelos, coloque la muestra en un portaobjetos, agregue una gota de colorante y cubra con el cubreobjetos. Para las mitocondrias tiña con verde de malaquita. Recuerde que el tamaño máximo de las mitocondrias oscila en los 7 micrómetros y las pequeñas hasta el micrómetro.



### Protocolo alternativo

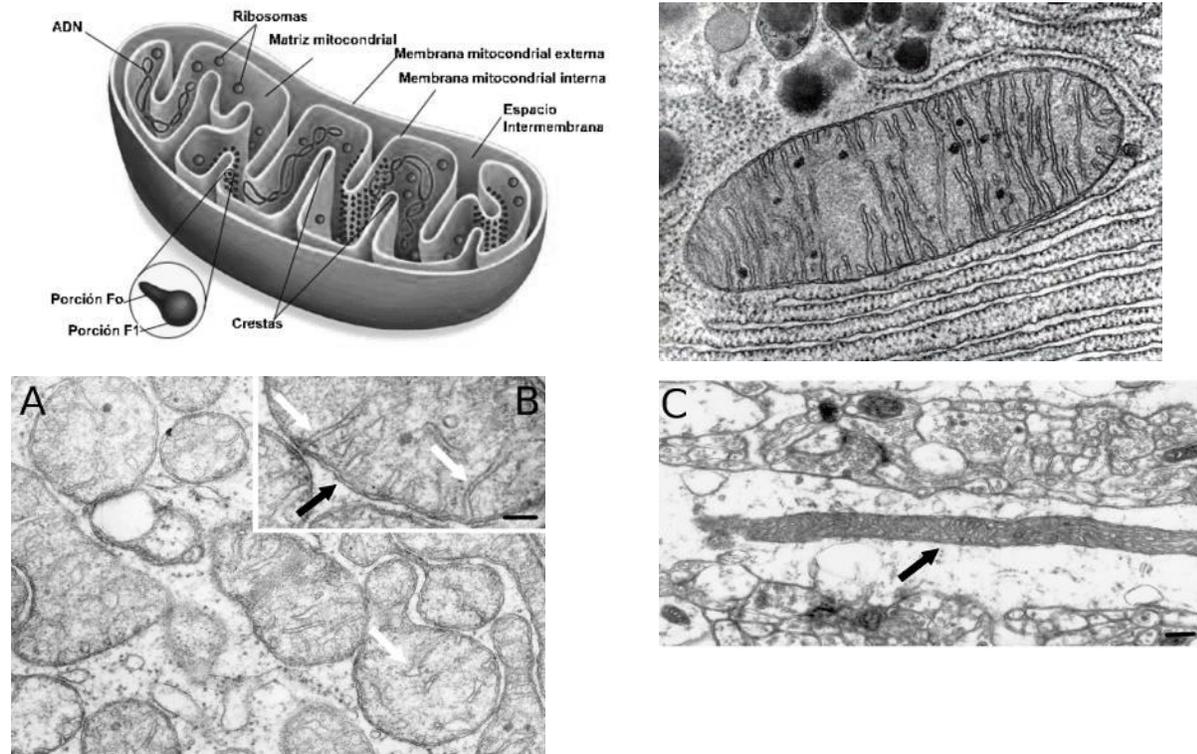
En forma alternativa, con el uso de la centrifuga en pasos rápidos se puede obtener mitocondrias, aunque con menor calidad.

1. Con un homogeneizador de aspas o vidrio, se homogeneiza el tejido (3 a 5 gr., rico en mitocondrias) en dos volúmenes de TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%). Durante el homogeneizado mantenga la muestra en hielo y evite la formación de espuma (característica de un exceso de molido).

2. Centrifugue a 200 xg, por 5 min. a 4°C. Descarte el precipitado que contiene basura.

3. Centrifugue (1,500 xg por 10 min. a 4°C).

4. Con cuidado por decantación retire el sobrenadante a un tubo limpio, recordando que en esta fase se encuentran las mitocondrias. En el precipitado oscuro que queda en el tubo se encuentran los núcleos.
5. El sobrenadante se centrifuga a 14,000 xg por 15 minutos a 4 C.
6. Puede realizar las observaciones utilizando una tinción simple con verde de malaquita. Coloque la muestra en un portaobjetos, agregue una gota de colorante y coloque el cubreobjetos.



## Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describe en cada protocolo lo que sucede en cada paso.

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la práctica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

## PRÁCTICA 8: Cloroplastos

### INTRODUCCION:

En la sesión se busca promover el desarrollo de habilidades para la separación de plastos y su observación. Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Competencia: Comparar los métodos utilizados para la identificación de organelos en tejidos multicelulares, con base en la utilización de técnicas básicas, para su posterior aplicación en el campo profesional, con disciplina y respeto.

### Materiales y equipos

Tubos eppendorf

Tubos de centrífuga

Homogeneizador

Amortiguador STE y TEK (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y KCl al 1.5%)

Sacarosa

Centrífuga eppendorf

Centrífuga refrigerada

Mini fuga

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Al menos 1 gramo de tejido vegetal fresco, como espinacas. Un plátano, un jitomate chico, una papa.

Microscopio compuesto y papel para limpiar microscopio

### Metodología:

## Primera parte: Separación y observación de plástidos

Los cloroplastos de las células de espinaca se aislarán utilizando métodos estandarizados en el laboratorio.

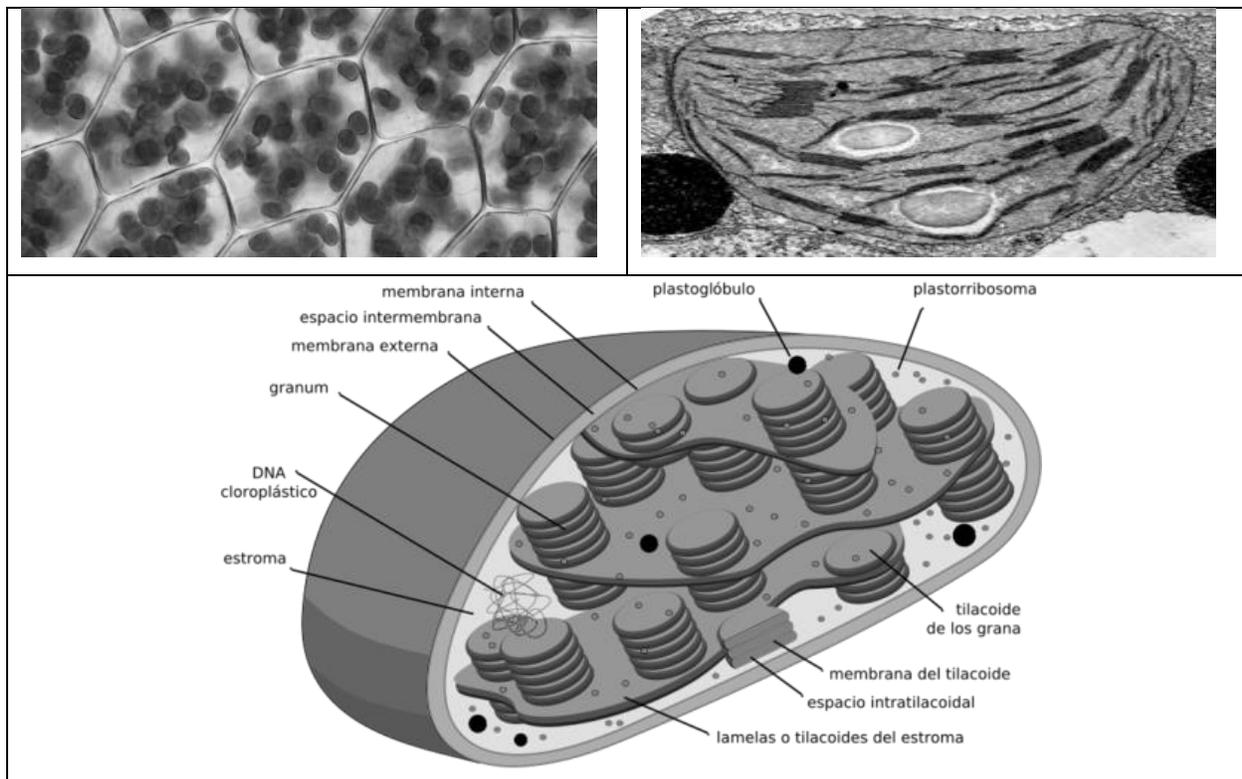
1. La espinaca se corta en pequeñas porciones en TEK o STE
2. Homogenice el tejido.
  - a. Utilice un homogeneizador de vidrio.
  - b. En forma alternativa se puede utilizar la maceración del tejido en un mortero pre congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Realice el macerado con cuidado para no producir espuma.
  - c. Otra alternativa es utilizar un homogeneizador de aspas o una licuadora.

## Aislamiento de la fracción de cloroplastos

1. Utilice hojas frescas de espinaca, a las cuales se les removieron las venas centrales.
2. Corte las hojas en pequeños pedazos y homogenícelas con alguno de los métodos antes descritos. Utilice al menos 5 ml de la solución amortiguadora por cada gramo de tejido.
3. Centrifugue el líquido a 200 g por 2 minutos a 4 °C. Verifique que los tubos de centrifuga estén balanceados.
4. Decante el sobrenadante a un tubo frío y centrifugue a 1500 xg por 5 minutos.
5. Decante y descarte el sobre nadante, añada unas gotas de la solución amortiguadora fría de Tris-NaCl al “pellet” que quedó en el tubo de centrifuga. Con cuidado re suspenda el “pellet” con una pipeta Pasteur.

## Observación microscópica de la fracción de cloroplastos

1. Con una pipeta Pasteur remueva una gota de la suspensión de cloroplastos y lleve a cabo una preparación húmeda. Use una pequeña gota de modo que no tenga que ejercer presión sobre el cubreobjetos, dañando los cloroplastos.
2. Examine los cloroplastos bajo el objetivo de alta potencia y luego y luego a 100x.
3. Observa la morfología de varios cloroplastos. Identifica los cloroplastos que tengan una morfología interna poco homogénea.
4. Represente con un diagrama los cloroplastos que muestren detalles internos e identifique sus estructuras.



## Observación microscópica de los cloroplastos tratados con urea

1. Coloque una pequeña gota de la suspensión de cloroplastos en un portaobjetos limpio. Añada una gota de la solución de urea saturada y coloque un cubreobjetos. Cuidado de no presionar el cubreobjetos.
2. Examine los cloroplastos bajo el objetivo de alta potencia y el de 100x.
3. Dibuje los cloroplastos que presenten una morfología alterada.

## Observación microscópica de los cloroplastos tratados con detergente

1. Prepare un montaje húmedo usando una pequeña gota de la suspensión de cloroplastos y una gota de solución de SDS al 20%.
2. Examine la preparación bajo el objetivo de alta potencia y el de 100x.

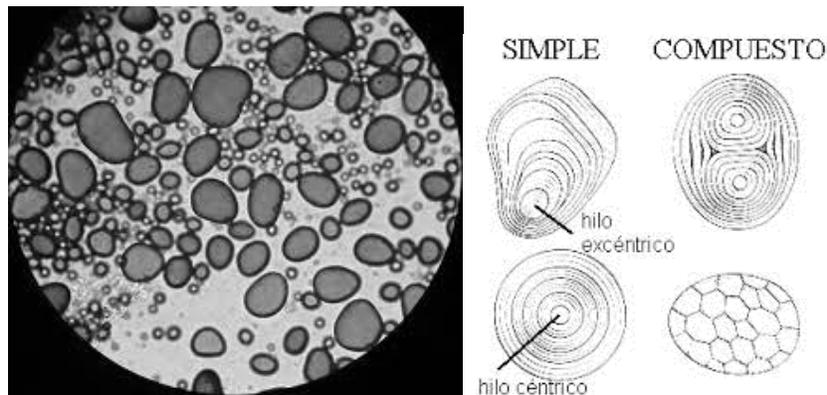
## Identificación de cromoplastos

1. De un tomate maduro corte finamente una pequeña porción de la parte pulposa.
2. Coloque el tejido sobre un portaobjetos, sin adicionar agua y se protege con un cubreobjetos.
3. Comprima suavemente la preparación con los dedos hasta obtener un completo aplastamiento del fragmento de pulpa de tomate.
4. Examine la preparación al microscopio con el objetivo 10x y seleccione una zona en la que las células estén menos aglutinadas.
5. Examine la preparación al microscopio con los objetivos 40x y 100x (utilice el aceite de inmersión).
6. Identifique los distintos orgánulos celulares visibles y dibuje las observaciones. Al microscopio se observan unas células muy separadas unas de otras, apreciándose en el citoplasma una serie de gránulos rojizos-anaranjados que son los cromoplastos. También se puede ver el núcleo redondeado. En las zonas poco alteradas por la compresión es posible visualizar grandes vacuolas incoloras, así como la presencia de gránulos de almidón en forma arriñonada.



## Observación de amiloplastos

1. Un plátano maduro se abre y con cuidado se corta muy finamente, colocando el material en un portaobjetos y distribuyéndolo procurando hacer un frotis, con la misma navaja.
2. Fijar la muestra por secado a temperatura ambiente (3 min.)
3. Agregar una gota de lugol y mantenga a temperatura ambiente durante 3 minutos.
4. Lavar suavemente con agua destilada.
5. Colocar un cubreobjetos y comprimir suavemente la preparación con los dedos.
6. Examinar la preparación al microscopio con el objetivo 10x y seleccionar una zona en la que las células estén menos aglutinadas. Posteriormente examine con los objetivos 40x y 100x (utilice el aceite de inmersión), cerrando el diafragma hasta el máximo permitido por el foco luminoso.
7. Identifique los distintos orgánulos celulares visibles. Los amiloplastos se observan como estructuras ovaladas y de tamaño considerable, por lo general, muestran capas concéntricas de crecimiento del grano, las cuales son muy variadas y específicas de cada especie de planta, fruto o semilla. En el plátano, los granos de almidón se tiñen de color violeta al reaccionar con el lugol.

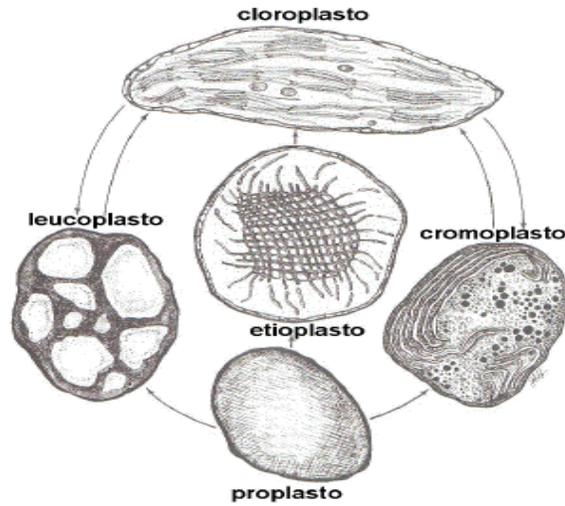


## Observación de leucoplastos.

El reactivo lugol, que se utiliza para observar estas estructuras, es a la vez un fijador (agente químico que destruye las células sin modificar su estructura) y un colorante de algunos tejidos vegetales (celulósicos, lignificados y suberificados), así como de sustancias de reserva (almidón), siendo de gran interés para el reconocimiento de diferentes especies vegetales, pues cada especie, dentro del mismo género, presenta distinta organización de los tejidos y almacena el almidón de forma diferente.

De la papa se toma una porción y se raspa con la punta de la lanceta. Se deposita el raspado sobre el portaobjetos y se añade una gota de agua y otra de lugol. Se coloca un cubre y se observa al microscopio.

Los gránulos de almidón se tiñen de color azul-violeta intenso por el yodo. Se pueden observar las capas de crecimiento excéntricas, que presentan los gránulos de almidón alrededor de un punto central.



## Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describe en cada protocolo lo que sucede en cada paso.

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la práctica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

## PRÁCTICA 9: Núcleo

### INTRODUCCION:

En la sesión se busca promover el desarrollo de habilidades para la observación del núcleo, reconociendo la heterocromatina y la eucromatina, así como los corpúsculos de Barr. Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión.

Competencia: Comparar los métodos utilizados para la identificación de organelos en tejidos multicelulares, con base en la utilización de técnicas básicas, para su posterior aplicación en el campo profesional, con disciplina y respeto.

### Materiales y equipos

Portaobjetos

Cubreobjetos

Aceto-orceina

Hisopos

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Disposición a efectuarse un raspado interno de la boca con un portaobjetos, así como donar muestras a los compañeros

Botella de agua potable, para enjuagarse la boca.

Microscopio compuesto y papel para limpiar microscopio

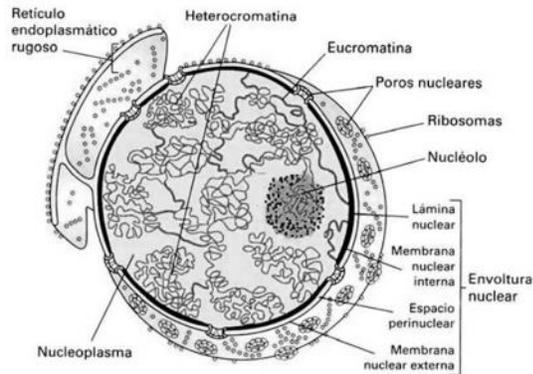
### Metodología:

#### Tinción con aceto/orceina

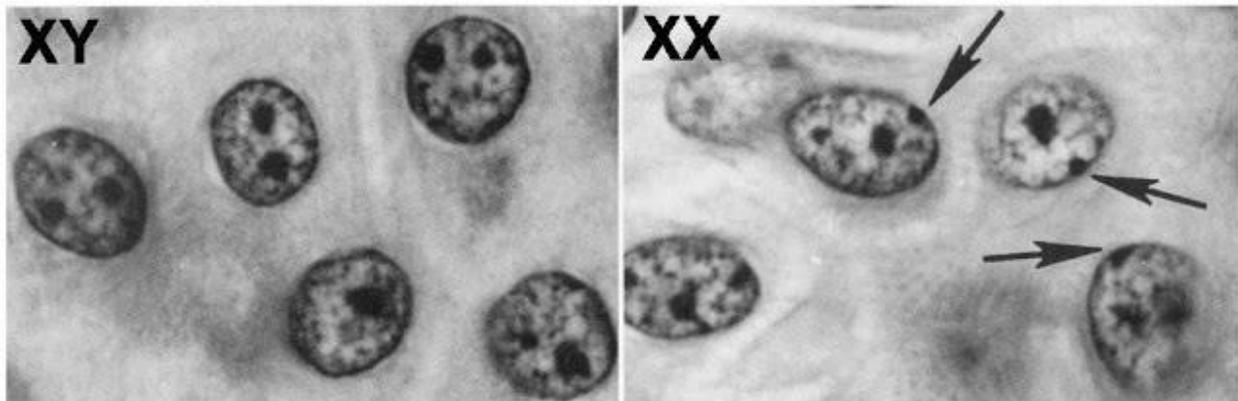
- 1) Los portaobjetos limpios, colocados en alcohol al 95% se marcan para identificar al donador de la muestra, adicionalmente indicando si se trata del lado derecho (D) o izquierdo (I) de la boca.
- 2) La boca se enjuaga con agua
- 3) Con el hisopo se hace un raspado suave de la mucosa bucal marcando el primer material obtenido.
- 4) Posteriormente se realiza un segundo raspado suave sin lesionar la mucosa y se extiende sobre el portaobjeto procurando que el frotis no quede demasiado delgado. Rápidamente, para evitar que se seque la preparación, se procede a la fijación y a la tinción.
- 5) En el portaobjetos que contiene el frotis de la mucosa bucal se deja caer 1 gota de solución de aceto-orceína en el centro de la preparación y se coloca un cubre objeto.
- 6) Buscando eliminar el excedente de colorante y distribuir la muestra, se coloca un papel filtro y se hace una ligera presión con el pulgar de un extremo al otro del portaobjeto.
- 7) La observación de la preparación debe hacerse de inmediato. Es importante utilizar adecuadamente la iluminación Köheler, el juego con la profundidad de campo y el adecuado manejo del micrómetro.

8) Identifique el núcleo, la heterocromatina, la eucromatina y en su caso el corpúsculo de Barr

Los cuerpos de Barr pueden teñirse mediante una gran cantidad de colorantes como tionina, hematoxilina, verde de metilo y con la técnica de Fulgen seguida por una hidrólisis ácida. El método más sencillo y utilizado a menudo es el frotis de mucosa obtenido por un raspado suave de la mucosa de la boca, extendida en la laminilla y luego teñida. Por lo general, se analizan al microscopio entre 50 y 100 células, debido a que la cromatina X se observa con menor frecuencia en este tipo de tejido.



Estructuras del núcleo



En la imagen del lado derecho son señalados los corpúsculos de barr.

## PRÁCTICA 10: Mitosis

### INTRODUCCION:

En una primera parte se busca promover el desarrollo de habilidades para la observación de los estadios de mitosis. Posteriormente la identificación de células reproductivas de organismos dioicos.

Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión, así como la introducción para el reporte, por parte del estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

Revise los estadios de la mitosis y meiosis, esquematícelos y resuma las características de cada estadio.

Competencia: Comparar las metodologías convencionales para la descripción de los estadios de la división celular, explorando las técnicas de microscopía en forma profesional

### Materiales y Equipos

Estuche de disección

Cubreobjetos

Portaobjetos

Vaso de precipitado de 50 ml

Navaja

Laminillas

Termoplato

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Microscopio compuesto y papel para limpiar microscopio

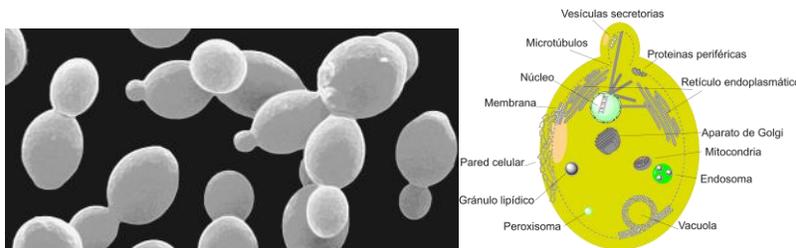
Cebollas blancas, que previamente se colocó en agua para desarrollar raíces.

### METODOLOGIA:

#### Primera parte: Examinando Células de Levadura

1.- Mezcle un poco de azúcar en agua con levaduras y deje por unos 5 minutos la mezcla. Usando una pipeta Pasteur, transferir varias gotas de levaduras a un portaobjetos. Agregar una gota de rojo neutro y colocar el cubreobjetos. Usar aumento (40 X) para observar la levadura.

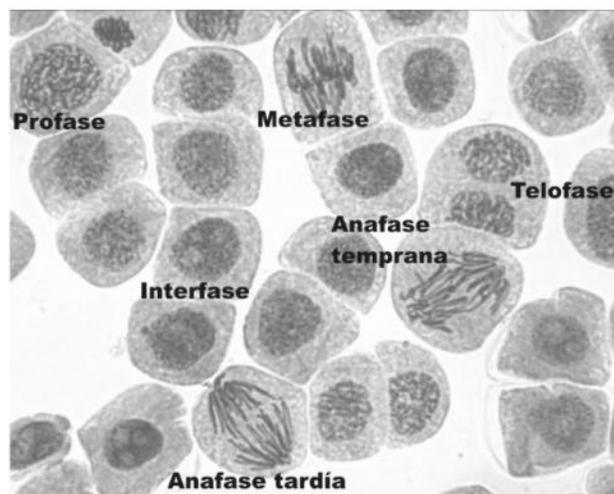
2.- Bajo condiciones óptimas, las levaduras se multiplican por gemación, que involucra un proceso en el citoplasma con un subsiguiente desprendimiento de una nueva célula. Busque en su preparado, células con yemas.



## Segunda parte: Observación de mitosis

Al menos una semana antes de la sesión, escoja una cebolla fresca de 5 a 7 cm de diámetro. Quite las raíces y fibras secas de la base del bulbo.

1. Inserte 3 palillos de forma que la cebolla se pueda suspender en un vaso o recipiente con agua, de tal forma que las raíces toquen continuamente el agua.
2. Procedimiento de tinción:
  - a. Elija de la cebolla una o varias raíces completa. La región de mayor interés es la apical (zona de crecimiento).
  - b. Con la hoja de afeitar de un solo filo corte la mitad inferior de la punta de una raíz. Póngala en un vaso pequeño y cúbrala con colorante de acetocarmin. Caliente paulatinamente el vaso con el colorante de 3 a 5 minutos, evitando que el líquido hierva.
  - c. Corte la parte más intensamente teñida de la punta de la raíz y colóquela en un portaobjetos, agregándole una gota de acetocarmin. Corte la raíz en pequeños trozos y cúbrala con un portaobjetos. Coloque papel absorbente sobre la preparación y con el borrador de un lápiz presione firmemente, para convertir el material en una capa delgada, evitando resbale el cubreobjetos. Limpie el exceso de colorante con papel.
  - d. Localice en la preparación a las células que presenten estructuras filamentosas teñidas más intensamente.
  - e. Localice y esquematice una célula que se encuentre en: a) Interfase. b) Profase. c) Metafase. d) Anafase. e) Telofase. Preste especial atención en la forma y disposición de los cromosomas. Considerando que la mayoría de las células que se observen estarán en interfase, se recomienda ser persistente en la búsqueda de los diferentes estadios de la mitosis.



Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la práctica, es decir interprete lo que se hace en cada paso. Esquematice lo observado en el microscopio. Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

## PRÁCTICA 11: Meiosis

### INTRODUCCION:

En una se busca promover el desarrollo de habilidades para la observación de células asociadas a la meiosis. Posteriormente la identificación de células reproductivas de organismos dioicos.

Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión, así como la introducción para el reporte, por parte del estudiante

Información relacionada con el marco de referencia:

Revise los estadios de la meiosis, esquematícelos y resume las características de cada estadio.

Competencia: Comparar las metodologías convencionales para la descripción de los estadios de la división celular, explorando las técnicas de microscopía en forma profesional

### Materiales y Equipos

Estuche de disección

Cubreobjetos y Portaobjetos

Vaso de precipitado de 50 ml

Tubos cónicos de centrífuga de 15 mL

Pipetas Pasteur con bulbo.

Pipetas graduadas de 5 mL

Caja de Petri

Porta y cubre objetos

Estuche de disección

Solución Wright y Fijador "buffer"

Aceite de inmersión

Preparaciones permanentes de diferentes tejidos gaméticos

Termoplato

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Microscopio compuesto y papel para limpiar microscopio

Para la sesión de laboratorio se espera contar con donadores de esperma.

### METODOLOGIA:

NOTA IMPORTANTE PARA LA PRACTICA SE TENDRAN DISPONIBLES LAMINILLAS DE GONADAS DE DIFERENTES TIPOS DE ORGANISMOS NO SERA NECESARIO SACRIFICAR A UN ORGANISMO

Por otro lado, será muy interesante contar con donadores de esperma para observar los espermatozoides en vivo

### Observación de espermatozoides en vivo

1. A partir de la muestra donada, tome una gota de semen y dépositelo en un portaobjetos.

2. Coloque un cubreobjetos y observe con los menores aumentos, utilizando la menor cantidad de luz posible.
3. Observe las células, con el mayor aumento de 100x utilizando adecuadamente el aceite de inmersión, la iluminación Köhler y optimizando la iluminación,
4. Esquematice lo observado.

### Tinción Wright

Preparación de laminillas

1. Con una pipeta Pasteur tomar una muestra de espermatozoides y colocar una gota en un extremo de un portaobjetos.
2. Con el extremo de un segundo portaobjetos distribuir la muestra de manera homogénea a manera de frotis, repartiendo lo mejor posible la muestra.
3. Agregar 3 gotas de solución Wright y cubriendo el portaobjetos en el interior de una caja Petri.
4. Esperar 5 minutos
5. Agregar 3 gotas del fijador "búfer".
6. Esperar 7 minutos.
7. Lavar con agua destilada.
8. Secar al aire.
9. Observar al microscopio

### Observación de laminillas

1. Observe el tejido utilizando los menores aumentos, hasta localizar zonas donde se puedan identificar claramente a las células.
2. Incremente el aumento hasta 100x utilizando adecuadamente el aceite de inmersión.
3. Utilizando la iluminación Köhler y optimizando la iluminación, observe las células, procurando identificar organelos internos, especialmente del sistema de membranas.
4. Esquematice sus observaciones, indicando los datos de la laminilla y técnica de tinción.

No se olvide utilizar ampliamente el sistema de iluminación, así como los campos de poca y gran profundidad, así como el uso del micrómetro para el adecuado enfoque por cada campo.

### Observación de laminillas

1. En cada una de las laminillas procure reconocer los diferentes tipos de gametos. Utilice el microscopio a 100x.

Esquematice sus observaciones e intérprete lo observado.

## Actividad complementaria, básica para las prácticas siguientes. Uso de los micropipeteadores automáticos

Para las siguientes sesiones es importante poder manejar adecuadamente los micropipeteadores automáticos, particularmente en las sesiones relacionado con los aspectos del estudio del ADN.

Materiales y equipos requeridos:

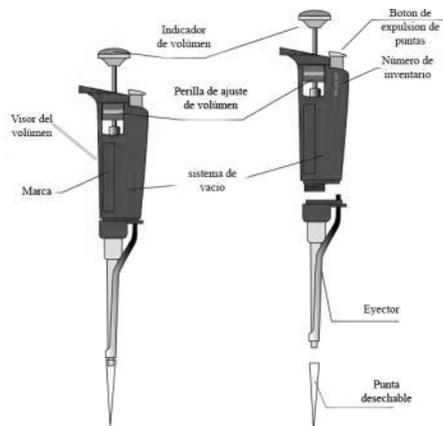
Puntas de pipeteador automático, Pipeteas Pasteur

Pipetas de diferentes medidas

Minifuga

Pipeteadores automáticos

Pistones para pipetas



|                |                            |                     |
|----------------|----------------------------|---------------------|
| Pipeta         | 100-1000                   |                     |
| Volumen máximo | 1,000 $\mu\text{l}$ = 1 ml |                     |
| Arriba         | 1                          | 1,000 $\mu\text{l}$ |
| En medio       | 1                          | 100 $\mu\text{l}$   |
| abajo          | 0                          | 0                   |

|                            |                   |
|----------------------------|-------------------|
| 20-200                     |                   |
| 200 $\mu\text{l}$ = 0.2 ml |                   |
| 2                          | 200 $\mu\text{l}$ |
| 2                          | 20 $\mu\text{l}$  |
| 0                          | 0                 |

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| 2-20                       |                  |
| 20 $\mu\text{l}$ = 0.02 ml |                  |
| 2                          | 20 $\mu\text{l}$ |
| 2                          | 2 $\mu\text{l}$  |
| 0                          | 0                |

|        |                   |
|--------|-------------------|
| máximo | 1 ml              |
| mínimo | 100 $\mu\text{l}$ |

|                   |
|-------------------|
| 200 $\mu\text{l}$ |
| 20 $\mu\text{l}$  |

|                  |
|------------------|
| 20 $\mu\text{l}$ |
| 2 $\mu\text{l}$  |

## Ejercicio a:

- Deposite los siguientes volúmenes (en micro litros):

| Tubo | Solución I<br>(agua) | Sol. II<br>(aceite) | Sol. III<br>(alcohol) |
|------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| 1    | 40                   | 15                  | ---                   |
| 2    | 40                   | ---                 | 40                    |
| 3    | 40                   | 10                  | 10                    |

- Centrifugue

- Extraiga las fases y anote los volúmenes recuperados.

## Ejercicio b:

- Deposite en un trozo de papel aluminio los siguientes volúmenes:

| Muestra | Solución I<br>(agua) | Sol. II<br>(aceite) | Sol. IV<br>(colorante) |
|---------|----------------------|---------------------|------------------------|
| 1       | 4                    | ---                 | 2                      |
| 2       | 4                    | 4                   | 2                      |

- Homogeneice y solo coloque el agua con el colorante en el pozo del gel, en la muestra 2, tenga cuidado de no agregar aceite

## Ejercicio c:

- Deposite los siguientes volúmenes en un tubo (en microlitros):

| Tubo | Solución I<br>(agua) | Sol. II<br>(aceite) | Sol. III<br>(alcohol) |
|------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| 1    | 0.5                  | 0.5                 | ---                   |
| 2    | 0.5                  | ---                 | 0.5                   |
| 3    | 0.3                  | 0.3                 | 0.4                   |

- Centrifugue y extraiga el volumen completo, que en los tres ejercicios debe ser de 1 microlitro

## Ejercicio d:

Para cada pipeteador:

- 1.- En una balanza coloque un recipiente (acorde a los volúmenes que posteriormente se manejaran)
- 2.- Acorde al pipeteador, tome el menor volumen posible de agua destilada y coloque en el recipiente que tiene en la balanza, anote el resultado.
- 3.- En eventos independientes, tome al menos 4 volúmenes diferentes de agua destilada y colóquelo en el recipiente que tiene en la balanza, anote el resultado.

4.- Grafique el resultado para cada pipeteador, anotando el número de inventario del equipo.

### **Con pipetas de gran volumen (mayor del mL)**

Para las siguientes sesiones prácticas también se requiere un dominio de las técnicas de pipeteo de grandes volúmenes, por lo que se plantean solo recomendaciones específicas:

Nunca se aspire con la boca.

No moje los pistones con los reactivos.

### **Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis**

Analice cada uno de los pasos, con base en la información teórica de la práctica, es decir interprete lo que se hace en cada paso.

Con base en el análisis, describa puntualmente lo que aprendió.

## PRÁCTICA 12: Tecnología de ADN

### INTRODUCCION:

En una primera parte se practicarán diversos protocolos de extracción de ADN para posteriormente evaluar su calidad y cantidad utilizando métodos electroforéticos. Con el objetivo de buscar la mayor racionalización en las actividades que se desarrollaran se explican los pasos de las metodologías que se utilizarán.

Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión, así como la introducción para el reporte, por parte del estudiante

Competencia: Valorar diferentes metodologías de la tecnología de ADN a nivel celular para ejemplificar su aplicación, con actitud profesional

### Generalidades de los protocolos.

El primer paso de los métodos moleculares, aplicados a los estudios poblacionales es la extracción del ADN. En la extracción de ácidos nucleicos, existen cinco etapas principales: 1) conservación de tejidos, 2) homogenización de tejidos, 3) degradación y eliminación de compuestos orgánicos diferentes al ADN o ARN, 4) precipitación de los ácidos nucleicos y 5) resuspensión y conservación.

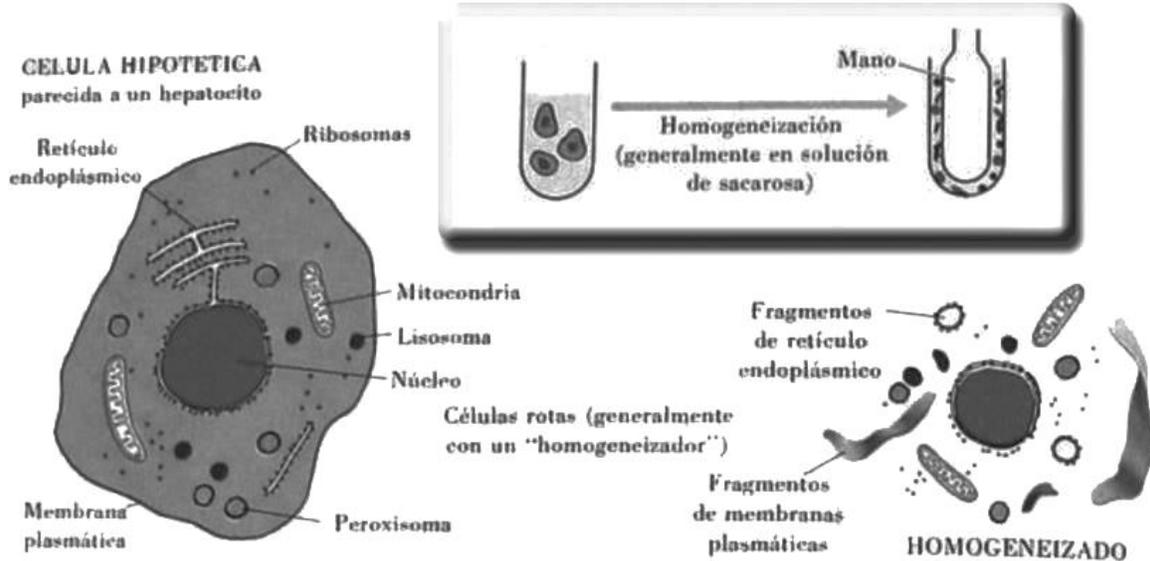
#### Conservación

Para la conservación de tejidos existen diversas alternativas, las cuales son utilizadas de acuerdo a las condiciones específicas de trabajo. La técnica de mayor eficacia es la de crio-conservación en nitrógeno líquido, pero lamentablemente es la que presenta una mayor dificultad en su aplicación, ya que son requeridos recipientes especiales y facilidades para la adquisición del nitrógeno líquido.

Una alternativa fácil de aplicar en cualquier lugar de México, es la combinación entre el uso de “Hielo seco” (dióxido de carbono comprimido), para el transporte de muestras hasta el laboratorio y la conservación en ultracongelador a temperaturas menores de -70 °C. Con el hielo seco también se pueden congelar rápidamente las muestras, ya que, al ponerlo en contacto con alcohol o éter, disminuye notablemente la temperatura y para protección de las muestras solo se requieren utilizar bolsas de plástico. En trabajo de campo, se recomienda poner en una bolsa de plástico a la muestra, la cual se introduce en otra bolsa, a la que se le agrega el hielo seco y el alcohol, resultando una reacción inmediata que literalmente congela a la muestra.

Otras alternativas, incluyen el uso de etanol, con el que se deshidrata rápidamente la muestra, o soluciones hipersalinas con DMSO al 20% y en casos especiales la deshidratación con el sol, así como con otros agentes castrantes de la humedad.

## Homogenización



Para facilitar la degradación de los tejidos, sin dañar los ácidos nucleicos, podemos combinar el uso de métodos físicos con los químicos. El más eficiente de los métodos físicos, involucra la congelación de la muestra y su posterior macerado en un mortero precongelado. La congelación más recomendable se logra con nitrógeno líquido y como método alternativo, con el uso de “hielo seco” y etanol.

Debido a las dificultades operativas de estas técnicas, es posible utilizar homogeneizadores de vidrio (Potter Elvehjen) y lo más común, es el macerado con una navaja sobre una superficie sólida, como podría ser un portaobjetos.

Posteriormente se aplican métodos de homogenizado químico, con detergentes (para desnaturalizar los lípidos) y enzimas que facilitan la degradación de las proteínas (como proteinasa K). Con soluciones amortiguadoras se mantienen las condiciones salinas (con KCl 1 mM) y de pH neutro en la muestra (Tris-HCl, 0.25mM, pH 7.8 a 8.0). Adicionalmente se agrega EDTA (0.02 a 1.0 mM), como agente castrante de los iones magnesio y calcio, requeridos para la acción de las exonucleasas que degradan los ácidos nucleicos.

Para garantizar una adecuada reacción, los tejidos macerados, se colocan en tubos de 1.5 ml, con el amortiguador (TES, TEK o TEN), el detergente (comúnmente SDS al 0.2 % u otros detergentes no iónicos como el IGEPAL) y proteínas K, posteriormente se tapan herméticamente y se mantienen en agitación constante, con temperaturas desde la ambiental (TA) hasta los 65 °C. Cabe aclarar que el tiempo de digestión química, varía dependiendo de la naturaleza del tejido y la técnica de conservación, ocupándose desde una hasta veinticuatro horas. Los tiempos y cantidades de reactivos se deben estandarizar, buscando evitar la sobre digestión por efecto de las exonucleasas.

Otros agentes utilizados en el homogenizado químico son la albumina (al 0.5% para remover ácidos y fosfolípidos), sorbitol o manitol (balance iónico), carbonato de sodio (controlar la concentración de sales), sacarosa (mantener la densidad del medio).

## Degradación y eliminación de compuestos orgánicos

Para la degradación de los compuestos orgánicos, generalmente se utiliza fenol estabilizado, cloroformo estabilizado con alcohol isoamílico o cloroformo. Dependiendo de la técnica de conservación, así como

de las condiciones y tipo de tejido, se elige la técnica más adecuada. Para la eliminación de los compuestos, en cada paso se utilizan técnicas de centrifugación, con velocidades superiores a 10,000 xg con tiempos superiores a los 5 minutos.

### Precipitación de los ácidos nucleicos

Después de la eliminación de los compuestos orgánicos, en solución quedan los ácidos nucleicos, debido a su alto gradiente de sedimentación en agua (o en el amortiguador). Para precipitarlos, a la solución se le incrementa notablemente la salinidad (con acetato o cloruro de sodio) y se le agrega alcohol y posteriormente es centrifugado en velocidades superiores a 10,000 xg por más de 10 minutos.

Cabe aclarar, que comúnmente son utilizados dos tipos de alcohol, el etanol y el isopropanol. Con etanol, se necesita facilitar la precipitación utilizando temperaturas bajas por largos periodos (la noche a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o una hora a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). En algunos casos, pueden requerirse sucesivos lavados con alcohol, para eliminar las sales.

Una vez formado el precipitado (el cual puede no observarse a simple vista), se elimina el alcohol, por centrifugación, decantación y evaporación. El precipitado de los ácidos nucleicos, en caso de que se observe, pasara de un color blanquecino, cuando está húmedo, a uno semitransparente, cuando está totalmente seco. Es importante eliminar totalmente el alcohol y las sales, ya que pueden interferir con las reacciones posteriores.

### Resuspensión y conservación

Para la resuspensión, es prudente considerar el uso que se le dará al ADN. En el caso de requerir la muestra por unos cuantos días, para PCR (reacción de polimerasas en cadena, por sus siglas en ingles), el precipitado obtenido previamente puede resuspenderse en agua que preferentemente haya sido destilada, des ionizada, nano purificada y esterilizada ( $\text{H}_2\text{O} \bullet \text{ddue}$ ).

Para una aplicación general se conserva en TE y en algunos casos es recomendable agregarle enzimas que degraden el ARN, como la RNAsa. La posterior conservación se realiza a bajas temperaturas, como la de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  cuando se utilizará en las siguientes semanas, o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para mantenerla por meses o incluso años.

Los protocolos específicos para la extracción del ADN dependerán de las muestras y costos de extracción permisibles (en tiempo y esfuerzo), que van desde unos cuantos pesos hasta decenas de pesos. En el primer caso, con costos muy bajos, encontramos las técnicas de extracción fenólica o de cloroformo que requieren al menos unas 4 horas de dedicación.

En el mercado existen juegos comerciales, con un costo de alrededor de 3 a 6 veces el equivalente al de una extracción convencional, pero que requieren generalmente una hora de trabajo en laboratorio y generalmente con una mayor garantía de reproducibilidad.

Competencia: Valorar diferentes metodologías de la tecnología de ADN a nivel celular para ejemplificar su aplicación, con actitud profesional

### Materiales y Equipos

Pinzas

Navajas de un solo filo

Portaobjetos estéril

Tubos cónicos de centrifuga de 1.6 mL

Pipetas Pasteur con bulbo.

Micropipetas automáticas

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Tejido fresco para la extracción de ADN

## Métodos de extracción de ADN

### Extracción de ADN por el método de cloroformo

1. Homogeneizar el tejido (40 a 200 mg) con 613µL de solución de lisis (10mM Tris; 400 mM NaCl; 2 mM Na<sub>2</sub>\*EDTA) 30µL SDS (al 20% en TEN -solución de lisis-) y 7 µl de proteinasa K (20 µg /ml). La mezcla se homogeneiza y se mantiene en agitación constante de 5 a 24 horas.

Nota: es importante verificar la adecuada agitación durante la primera hora, regla empírica, recuerde que con bajo tiempo de digestión hay poca separación de ADN, contrastantemente un tiempo prolongado puede incrementar el tiempo de exposición a las DNAsas, del mismo tejido, y en consecuencia también hay poca obtención de ADN. Un tiempo generalmente adecuado es de 12 a 14 horas (overnight).

2. Al tubo se le agregan 375 µl de NaCl 6M (previamente filtrado). Para lograr una adecuada homogeneización puede utilizar el Vortex durante 10 segundos, y se centrifuga en TA (temperatura ambiente) por 15 min. a 14,000 xg.
3. Pasar a un tubo limpio los 780 µl de la fase superior, se le agregan 750 µl de Cloroformo, y después de homogeneizar completamente (con vortex 10 segundos), se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min.
4. Posteriormente se toman aproximadamente 750 µl del sobrenadante, evitando tomar o tocar la interfase que contiene proteínas. Considere que es preferible tomar menos líquido, pero no contaminado.
5. Al sobrenadante se le agregan 750 µl de Isopropanol, se homogeneiza. Es recomendable dejar reposar el tubo en posición vertical, durante unos 30 min a TA o en refrigerador, para facilitar la precipitación del ADN.
6. Las muestras son centrifugadas a 10,000 rpm por 15 min, TA.
7. El sobrenadante es retirado cuidadosamente, procurando no perturbar el fondo del tubo, en donde está depositado el ADN.
8. Para secar el precipitado (pellet), se deja el tubo abierto a 37 C, durante media hora o se coloca en un sistema de vacío.
9. Finalmente, el pellet seco, se resuspende con 50 µl de TE. Para conservar la muestra se guarda en congelación a -20 C (durante meses) o a -80 °C (durante años).

### Extracción Salina

Descrito por Aljanabi y Martínez (1997)

- 1- De 30 a 200 mg de tejido se homogeneiza en 400  $\mu$ l del amortiguador STE (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0), 40  $\mu$ l de SDS 20% (concentración final 2%) y 8  $\mu$ l de Proteinasa K (20mg/ml)
- 2- Las muestras se incuban a 55 °C durante 1.5 h a toda la noche; se mantienen los tubos cerrados hasta que alcanzan la temperatura ambiente para evitar contaminación cruzada por escape de aerosoles entre muestras.
- 3- Se añaden 300  $\mu$ l de NaCl 6M (NaCl saturado en H<sub>2</sub>O) y mezclan por 30 s a 1200 r.p.m.
- 4- Centrifugar por 30 min a 10,000 g.
- 5- La fase acuosa es transferida a un tubo nuevo y se le añade un volumen igual de isopropanol absoluto, mezclado e incubado al menos por 1 h a -20 °C.
- 6- Las muestras son centrifugadas a 12,000 g a 4°C por 20 min., descartado el sobrenadante y el pellet es lavado con etanol 75%
- 7- El precipitado es secado y resuspendido en 50  $\mu$ l de TE pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y almacenado a -80 °C hasta su uso.

### Extracción de ADN con CTAB

1. Aproximadamente de 10 a 40 mg de tejido se colocan en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Al tubo se le agregan 200  $\mu$ l de solución de lisis (200 mM Tris Base, pH 7.4; 0.5 % SDS; 250 mM NaCl y 25 mM EDTA\*Na<sub>2</sub>). La mezcla se homogeneiza y se mantiene en agitación constante durante 20 minutos. Nota: es importante verificar la adecuada agitación.
3. A la muestra agregarle 200  $\mu$ l de solución CTAB (CTAB 2%, PVP 0.1 %, SDS 0.1%, 0.2  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM TRIS base 10 mM y 20 mM EDTA\*Na<sub>2</sub>), y se mantiene a 65 C.
4. Se agregan 300  $\mu$ l de LiCl 5M, logrando una adecuada homogeneización y se centrifuga en TA (temperatura ambiente) por 15 min. a 14,000 xg.
5. A un tubo limpio con 780  $\mu$ l del sobrenadante, se le agregan 750  $\mu$ l de Cloroformo, y después de homogeneizar completamente (con vortex 10 segundos), se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min.
6. Posteriormente se toman aproximadamente 750  $\mu$ l del sobrenadante, evitando tomar o tocar la interface que contiene proteínas.
7. Al sobrenadante se le agregan 750  $\mu$ l de Isopropanol, se homogeneiza. Es recomendable dejar reposar el tubo en posición vertical, durante unos 30 min a TA o en refrigerador, para facilitar la precipitación del ADN.
8. Las muestras son centrifugadas a 10,000 rpm por 15 min, TA.
9. El sobrenadante es retirado cuidadosamente, procurando no disturbar el pellet donde está depositado el ADN.
10. Para secar el precipitado, se deja el tubo abierto a 37 C, durante media hora o se coloca en un sistema de vacío.

Finalmente, el precipitado seco, se resuspende con 50  $\mu$ l de TE.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Contraste los resultados contra lo esperado de acuerdo a la bibliografía

## PRÁCTICA 13: Electroforesis

### Generalidades de la electroforesis

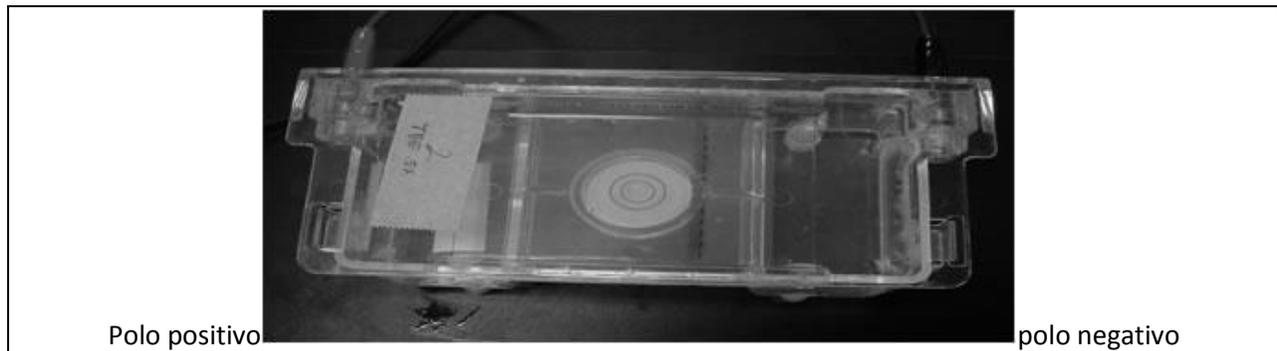
La electroforesis es el movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. En nuestro caso, la técnica se aplica para la separación por tamaño de los fragmentos en los ácidos nucleicos. Por efecto de la corriente eléctrica directa, las moléculas se mueven a través de una matriz inerte (de polímeros de agarosa o acrilamida), que se encuentra en un amortiguador, todos estos durante un tiempo determinado.



Considerando las características de las muestras, son diversas las variables que intervienen en la electroforesis y que es necesario controlar. Las principales a considerar son: características de la muestra, corriente eléctrica (Volts, Watts y Amperes), amortiguador, matriz (tipo y concentración) y otros reactivos.

### Descripción de la electroforesis

La electroforesis es el movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un gas o líquido como resultado de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. En nuestro caso, la técnica se aplica para la separación por tamaño de los fragmentos en los ácidos nucleicos. Por efecto de la corriente eléctrica directa, las moléculas se mueven a través de una matriz inerte (de polímeros de agarosa o acrilamida), que se encuentra en un amortiguador, todo esto durante un tiempo determinado.



Considerando las características de las muestras, son diversas las variables que intervienen en la electroforesis y que es necesario controlar. Las principales a considerar son: características de la muestra, corriente eléctrica (Volts, Watts y Amperes), amortiguador, matriz (tipo y concentración) y otros reactivos.

## Características de la muestra

Previo a la realización de una electroforesis, se debe tener una idea del tamaño de los fragmentos, para tomar adecuadas decisiones en las variables a controlar. La información requerida es mínima y puede ser subjetiva, separando los tamaños de las moléculas en tres categorías simples:

Tamaños grandes, fragmentos mayores de 2,000 pares de bases (pb)

Tamaños medianos, de entre 500 y 5,000 pb

Tamaños pequeños, menores de 1,000 pb

## Corriente eléctrica

Las tres variables a considerar son Volts, Watts y Amperes. Estas se relacionan directamente, la molécula será arrastrada por la fuerza del voltaje. El wattaje, está relacionado con la resistencia del medio y la intensidad de corriente, el efecto de valores altos producirá calor.

Los ácidos nucleicos son atraídos hacia el polo positivo o ánodo (generalmente señalado con el color rojo), debido a configuración que deja expuestos a los grupos fosfato, particularmente a los átomos de oxígeno. Por tal motivo en la matriz electroforética la muestra se coloca proximal al polo negativo o cátodo (con el color negro).

En las técnicas con ácidos nucleicos generalmente solo nos ocupamos de regular el voltaje y evitamos los efectos del calor, utilizando voltajes alrededor de 5 V/cm. Como regla empírica, utilizamos mayores voltajes cuando deseamos separar moléculas grandes y menores voltajes para moléculas de tamaño pequeño.

En resumen, los voltajes utilizados de acuerdo al tamaño de fragmento esperado, son los siguientes:

| Voltaje  | Fragmento |
|----------|-----------|
| 5 V / cm | 1 – 30 Kb |
| 4.5      | 0.5 – 10  |
| 3 – 4    | < 2       |

Nota: es posible utilizar voltajes mayores hasta de 10 V/cm, dependiendo de las necesidades experimentales.

Cuando se utiliza una gran resistencia en el medio (por ejemplo, por alta concentración en la matriz, altos voltajes, cambio en el amortiguador), para contrarrestar el calentamiento podemos introducir la charola de electroforesis en el refrigerador o utilizamos un sistema de enfriamiento para el amortiguador, y lo bombeamos a través de la charola.

## Amortiguador

Los amortiguadores deben reunir varias características, entre las que se incluyen: a) adecuada conductividad, b) estables a diferentes temperaturas, c) pH neutro que facilite el arrastre de las moléculas sin desnaturalizarlas y d) capacidad de castrar iones magnesio y calcio, los cuales pueden ser cofactores para la acción de las exonucleasas.

En forma convencional se utilizan los amortiguadores denominados TBE (Tris-borato-EDTA) y TAE (tris-acetato-EDTA). El primero favorece la electroforesis de moléculas chicas a medianas, en cambio el

segundo para moléculas grandes a medianas. El amortiguador, en las electroforesis de agarosa, cubre totalmente a la matriz inerte, pero es deseable que no exceda la superficie en más de 4 mm, ya que se pueden producir algunas aberraciones

Al igual que los reactivos de uso cotidiano, los amortiguadores se preparan más concentrados que la solución de uso, brindando una mayor durabilidad a TA. En el caso del TBE, se prepara en una concentración 5X y se usa a 0.5X, en el caso del TAE de 50X y se usa a 1 X. El EDTA di sódico utilizado, puede requerir mucho tiempo en su preparación, por lo que típicamente se prepara una solución 10X, garantizando que las soluciones queden cristalinas. Sin este cuidado, cuando se mezclan los componentes del amortiguador concentrado se obtiene una solución lechosa, con una rápida precipitación de sus componentes.

### Matriz

La matriz para la electroforesis se elabora con un polímero con las siguientes características: 1) no debe modificar a las moléculas de las muestras, 2) permita un eficiente paso de la corriente, 3) se pueda regular el tamaño del poro para favorecer el paso de las moléculas de acuerdo a su tamaño y 4) debe ser de fácil preparación y manipulación.

Los polímeros utilizados más comúnmente son la agarosa y la acrilamida. La primera, es de uso rutinario en una concentración de 0.8% y funciona más eficientemente con moléculas de medianas a grandes, pero si se incrementa la concentración o si se agregan aditivos, permite la visualización de moléculas pequeñas, inclusive a nivel de unidades o decenas de bases.

La matriz de acrilamida, utilizada en electroforesis verticales, permite una más eficiente regulación del tamaño de los poros que se forman entre los polímeros y se puede obtener una mayor resolución, por lo que es posible diferenciar tamaños de moléculas que difieren de solo una base. El proceso de preparación de la acrilamida es más laborioso y requiere cuidados especiales en su preparación. Es comúnmente preferido el uso de agarosa y se reserva el uso de la acrilamida para verificar el tamaño de bandas en muestras problemáticas o para tomar las fotografías para las publicaciones.

En forma empírica se ha establecido el uso de concentraciones altas (de 1 al 4%) para estudiar moléculas chicas, contrastantemente, las concentraciones menores del 0.8% y hasta el 0.4%, se utilizan para moléculas grandes. En concentraciones altas, para contrarrestar el efecto de la resistencia traducida en calor se utilizan bajos voltajes (menores de 5 V/cm hasta 2.5 V/cm), y en concentraciones rutinarias del 0.8 % o menores, es posible elevar el voltaje (hasta 10 V/cm), a pesar de que se puede generar una aberración debida a la velocidad de arrastre de las moléculas.

Las concentraciones recomendadas dependiendo del tamaño del fragmento esperado, son las siguientes:

|  | Agarosa | Fragmento |  |
|--|---------|-----------|--|
|  | 0.5 %   | 1-30 Kb   |  |
|  | 0.7     | 0.8 – 12  |  |
|  | 1.0     | 0.5 – 10  |  |
|  | 1.5     | 0.2 – 3   |  |

| Concentración de agarosa |      | Imagen exagerada del efecto del cambio de concentración                            |
|--------------------------|------|--|
| Normal                   | Pozo |  |
| Alta                     |      |  |
| Baja                     |      |  |

Imagen exagerada del efecto del cambio de concentración

## Otros reactivos.

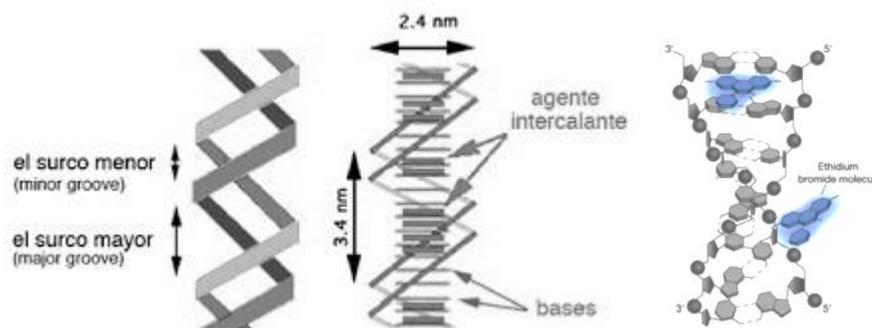
Considerando que las electroforesis horizontales son submarinas, para evitar o al menos disminuir la difusión de la muestra, se homogeniza con una solución hiperdensa de sacarosa (de hasta 4 M), a la que se le agrega azul de bromo fenol, que además tiñe a la muestra, permite verificar el avance de la electroforesis, debido a que avanza a una velocidad similar a la de moléculas de unos 500 pares de bases.

Dependiendo del experimento que se realice, a la solución híper-densa de azul de bromo fenol, se le pueden agregar otros reactivos, como urea que permite mantener parcial o totalmente desnaturalizados a los ácidos nucleicos, así como para desnaturalizar a las enzimas que se utilicen (como las endonucleasas) o que estén en el medio (como las exonucleasas, DNAsas y RNAsas).

Finalmente, para visualizar los fragmentos de los ácidos nucleicos, típicamente se utiliza Bromuro de Etidio, el cual se intercala entre las bases y fluoresce con la luz ultravioleta. Este reactivo es mutagénico y peligroso para la salud humana en bajas concentraciones, pero se puede manipular con cuidados básicos y resulta relativamente económico.

Para incorporar el bromuro en los ácidos nucleicos, se utilizan dos estrategias: 1) se agrega en el gel durante su preparación o 2) se "baña" el gel en una solución de agua con bromuro, durante 5 a 10 minutos y se enjuaga el excedente. Cuando se trabaja con bromuro de etidio incorporado al gel, se agrega justo antes de la polimerización de la agarosa, por lo que se sugiere utilizar guantes en los siguientes pasos.

Es importante aclarar, que el bromuro de etidio es atraído hacia el polo negativo (al contrario que los ácidos nucleicos), lo cual se debe tomar en cuenta para establecer la estrategia de tinción más adecuada, ya que, si se busca teñir fragmentos muy pequeños, el bromuro puede rebasarlos y en consecuencia no se logren visualizar.



## Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN, existen dos métodos indirectos que permiten estimar la concentración del ADN en las muestras, por visualización y mediante espectrofotómetro. En este curso solo se explicará la estimación por visualización.

### Estimación de la concentración de ADN por visualización.

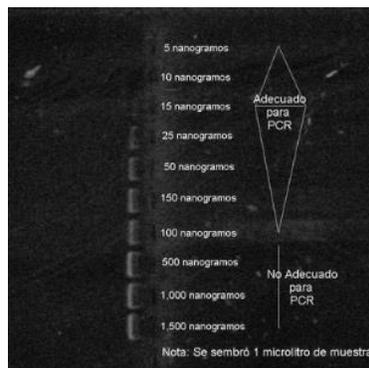
El método indirecto más recomendable para la determinación de la concentración de ADN en una muestra es mediante la visualización de un gel de electroforesis en el cual se colocan muestras con concentraciones conocidas.

El procedimiento requiere la preparación de una cámara de electroforesis, colocando cada una de las muestras que se desea evaluar en pozos individuales y dejando al menos 10 pozos libres.

Posteriormente se inicia la electroforesis con 6 v/cm y diez minutos antes de que concluya la corrida, se detiene la fuente de poder, se destapa la cámara de electroforesis, sembrando muestras de concentraciones conocidas.

Finalmente se cierra la cámara de electroforesis, se enciende nuevamente la fuente de poder, dejando que corra durante 10 minutos, se visualiza el producto con U.V. y se toma una fotografía.

En este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, lo cual se realiza visualmente o con el auxilio de algún programa computacional que contraste intensidades de color.



Competencia: Valorar diferentes metodologías de la tecnología de ADN a nivel celular para ejemplificar su aplicación, con actitud profesional

### Materiales y Equipos

Tubos cónicos de centrifuga de 1.6 mL

Pipetas Pasteur con bulbo.

Micropipeteas automáticas

Extracción de ADN

¿Qué debe llevar al laboratorio?

**CUIDADO EN LA SESION SE UTILIZA BROMURO DE ETIDIO el cual es considerado MUTAGENICO, TERATOGENICO Y CARCINOGENICO**

## Preparación agarosa en horno de microondas

Para verificar el producto de las extracciones de ADN en el curso, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Considerando que se trabaja con bromuro de etidio incorporado al gel, se recomienda enfáticamente utilizar guantes en todos los siguientes pasos.

1. En la preparación del gel para las cámaras de electroforesis chicas (minisub), coloque en un matraz Erlenmeyer 0.24 gr. de agar y agregue 20 ml del amortiguador TAE 1x.
2. Coloque el matraz en el horno de micro-ondas con el máximo poder hasta la ebullición, retire y homogeneice, repitiendo hasta que la solución sea cristalina.
3. Transfiera el agar a la charola de electroforesis y coloque los correspondientes peines.
4. Después de 15 minutos, con el agar solidificado, retire con cuidado los peines, jalándolos hacia arriba, en forma recta.

## Electroforesis

1. - Coloque la charola en la cámara de electroforesis.
2. Agregue a la cámara 300 ml de amortiguador TAE 1x (hasta que se cubran los pozos con el amortiguador)
3. En un tubo de centrífuga o sobre parafilm, coloque 8 ml de la muestra\*.
4. Agregue 2  $\mu$  l de Azul de bromofenol y agua destilada para llevar el volumen final a 10  $\mu$  l.
5. - Con el pipeteador automático homogeneice la muestra y transfírela a uno de los pozos del gel de agar. Tenga cuidado de no rasgar los pozos o el gel.
6. - Repita los tres últimos pasos para el resto de las muestras dejando al menos un pozo para colocar la escalera del fago lambda digerido con HindIII, según las instrucciones del fabricante.
7. - Revise las conexiones, que los pozos estén el polo negativo y encienda la fuente de poder programando el voltaje constante entre 2 y 5 V/cm (en la cámara minisub son aproximadamente 80 V, por 45 minutos). Con el menor voltaje se obtiene una mejor resolución de bandas, especialmente con fragmentos chicos.
8. - Permita que avance la electroforesis hasta que el azul de bromofenol recorra 2/3 de la distancia del gel.
9. Apague la fuente de poder y retire cuidadosamente el gel.
10. Visualicé el resultado de la electroforesis en un transiluminador U.V.

**NOTA: RECUERDE QUE LA LUZ U.V. PUEDE PRODUCIR EFECTOS NOCIVOS INMEDIATOS. CUANDO VISUALICE VERIFIQUE QUE ESTÁ USTED ADECUADAMENTE PROTEGIDO.**

Nota: \* La cantidad de muestra que se agregue variara dependiendo de la concentración de ADN. En la visualización cuando se agrega un exceso de ADN se observan aberraciones dendríticas en la muestra, por el contrario, si se agrega una baja concentración (menos de 5 ng) no se observará el ADN.

Estime la concentración de ADN por visualización.

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Anote las modificaciones del protocolo

Analice el trabajo realizado y los resultados. Se recomienda fotografiar e imprimir los resultados, para pegar la foto en la libreta. Interprete todo lo que se observa en el gel.

## PRÁCTICA 14 PCR

### INTRODUCCION:

Para la amplificación artificial de ADN o PCR se practicarán protocolos convencionales y la evaluación de los productos por métodos electroforéticos. Con el objetivo de buscar la mayor racionalización en las actividades que se desarrollaran se explican los pasos de las metodologías que se utilizarán.

Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión, así como la introducción para el reporte, por parte del estudiante

### Generalidades del PCR

La reacción en cadena de la polimerasa tiene tres pasos que se repiten cíclicamente, 1) desnaturalización de los ácidos nucleicos, 2) alineación de un cebador iniciador (primer), y 3) polimerización, por efecto de una polimerasa termo resistente, en un medio rico de nucleótidos libres (dNTPs). En un ciclo, a partir de una molécula se obtienen dos, en el segundo ciclo de dos se obtienen cuatro y siguiendo una progresión geométrica en 30 ciclos se tendrían 1, 073, 741, 755 copias. Para una eficiente reacción del PCR, se busca controlar numerosas variables, de las cuales las principales son: 1) Muestra de los ácidos nucleicos, 2) Condiciones químicas de la reacción y 3) condiciones físicas

#### Muestra de los Ácidos nucleicos

Generalmente los problemas en los resultados del PCR, están relacionados con la cantidad y calidad de ácidos nucleicos. En cuanto a la cantidad, regularmente se sugiere utilizar de 15 a 50 ng, no obstante, para la amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de muestras de ADN total, se amplía el rango de 15 a 200 ng, prefiriéndose los valores altos. Fuera de estos rangos es necesario utilizar técnicas complementarias o el uso de aditivos en la mezcla de reacción, lo que puede elevar sustancialmente los costos. En cuanto a la calidad, es preferible utilizar productos del tipo C1 (una banda clara y nítida, sin barrido, ver en interpretación de la electroforesis), aunque en muestras de ADN con barrido ligero (C2 y C3), se pueden obtener resultados adecuados. En muestras degradadas, generalmente se requiere utilizar técnicas complementarias

#### Condiciones químicas de la reacción

En la mezcla de reacción se utilizan diversos componentes, además del ADN que sirve de molde. Los componentes de una reacción típica, incluyen un cebador hacia adelante (forward o F), uno hacia atrás (reverse o R), mezcla de los dNTPs (deoxinucleotidos), polimerasa termo resistente (Taq polimerasa), iones magnesio (en forma de cloruro de Magnesio), amortiguador y agua destilada, des ionizada, ultra purificada y esterilizada (H<sub>2</sub>O ddue). Adicionalmente, dependiendo del tipo de termociclador podría utilizarse aceite mineral. La concentración de los cebadores F y R, ha sido ampliamente estandarizada, recomendándose utilizar de 0.5 a 1 µl de una solución con concentración de 20 µM, para una reacción de volumen total de 25 µL. La solución madre ("stock"), se prepara en una concentración de 50 a 100 µM, para garantizar una mejor conservación de los cebadores.

El diseño de los cebadores es básico para entender los resultados de una reacción de PCR. Es recomendable es uso de cebadores específicos, que tengan aproximadamente la misma proporción de C-G con respecto a A-T, evitando la formación de pasadores (dobles del cebador durante la reacción) o la formación de dímeros simples o pareados (unión de bases complementarias) por unión entre el mismo cebador o entre los cebadores.

Los dNTPs se agregan en exceso para cubrir adecuadamente las demandas de la reacción. En una reacción de 25  $\mu$ L, es común utilizar 2  $\mu$ L de una concentración de 2.5mM. Agregar una mayor cantidad implica un desperdicio de los nucleótidos, además de que pueden interferir en la reacción. La primera polimerasa termo resistente utilizada fue a Taq polimerasa, de la cual se utilizan de 0.25 a 1 unidad por reacción, no obstante, en la actualidad existen al menos 10 polimerasas de uso en las reacciones de PCR, de las cuales las más comerciales son las obtenidas de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent o Tli). Generalmente de la solución madre, se utilizan de 0.5 hasta 2  $\mu$ L por reacción.

El magnesio es requerido para una adecuada función de la polimerasa y se recomienda una concentración de 1.65 mM por reacción. En casos especiales, se puede utilizar hasta 4mM, aunque con el riesgo de disminuir la especificidad en la acción de la polimerasa. La preparación de la solución madre de 25 o 50 mM, es laboriosa y requiere de filtrado y esterilización de los reactivos, las que pueden ser muy difíciles de lograr en un laboratorio general, por lo que se recomienda adquirirla de proveedores especializados. El pH y el balance iónico, se logra con el uso de un amortiguador termo resistente, con tris-HCl (pH8.4) y cloruro de potasio.

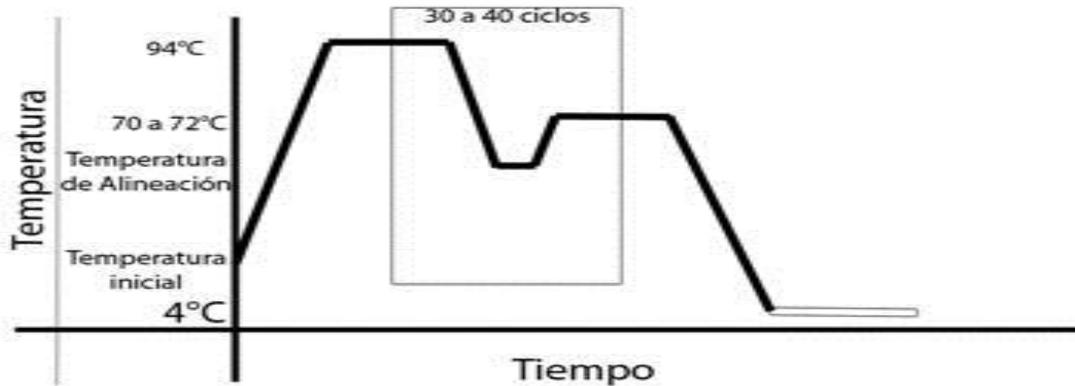
Cabe aclarar que en la reacción debido a los cambios de temperatura el pH variara desde aproximadamente 7 hasta 10. La preparación es sumamente complicada, por lo que se sugiere adquirirlas de una compañía especializada. Finalmente, para el agua, es posible obtenerla de un ultrapurificador y esterilizarla, manteniéndola en el área de trabajo de PCR.

Para lograr una mayor eficiencia en la reacción es posible agregar diversos aditivos, como formamida, DMSO o Tween 20 (se recomienda revisar la página de internet: <http://www.staff.uni-mainz.de/lieb/additiva.html>), los cuales son utilizados generalmente de forma empírica. Comercialmente se encuentran disponibles juegos de mezclas para PCR, como PCR-súper mixer, en los cuales incluyen total o parcialmente los reactivos requeridos, de tal forma que solo se requiere agregar la muestra a amplificar. Lamentablemente en estos juegos, la polimerasa puede perder actividad después de unas semanas o meses y típicamente recomiendan su uso antes de que se cumplan los seis meses de preparación. En los casos que se exceda el tiempo de conservación, suele ser requerido suplementar la mezcla con polimerasa fresca. En síntesis, la mezcla de reacción típica incluye los siguientes componentes y concentraciones:

| Reactivo  | Concentración final                |
|---|------------------------------------|
| dNTP's  | 0.2 mM (rango de 0.05 a .25 mM)    |
| Iniciador F   | 0.4 mM (rango de 0.2 a 1 mM)       |
| Iniciador R   | 0.4 mM (rango de 0.2 a 1 mM)       |
| Taq-Polimerasa  | 0.2 U (rango de 0.2 a 1 U)         |
| Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )  | 1.65 mM (rango 1.5 a 4 mM)         |
| ADN (molde o template)  | 15 a 200 ng                        |
| Amortiguador<br>(Tris-HCl 10 a 220 mM pH 8.4- y 50 a 55 mM de KCl), solución madre a 10 X | 1.1 X                              |
| Agua (H <sub>2</sub> O ddue)  | Volumen necesario para la reacción |

En los primeros termocicladores no se contaban con mecanismos para mantener la temperatura homogénea en todo el interior de los tubos de reacción, por lo que se agrega de uno a dos volúmenes de aceite mineral, previamente esterilizado y conservado en el área de trabajo de PCR.

## Condiciones físicas



Un ciclo regular requiere de cuatro etapas: 1) desnaturalización inicial, 2) ciclos de desnaturalización, alineación y polimerización, 3) polimerización final y 4) conservación. La desnaturalización inicial, se puede lograr eficientemente con 94 °C durante 5 minutos. Si existe la sospecha de que las muestras no están completamente purificadas (sospecha de proteínas), se puede elevar la temperatura inicial hasta los 96 °C durante 2 minutos y después a 94 °C por los 3 minutos restantes. Para algunos PCR, como el de RAPDs, puede ser recomendable omitir la desnaturalización inicial. La polimerasa puede perder efectividad durante la desnaturalización inicial, por lo que algunos fabricantes recomiendan agregarla después de esta desnaturalización inicial. Los ciclos, comprenden una desnaturalización inicial de 94 °C por 30 segundos, la alineación a la temperatura de alineación promedio o de fusión (T<sub>M</sub> por sus siglas en inglés) por 30 segundos y la polimerización a 72 °C por 1 minuto por cada mil pares de bases. La temperatura de alineación promedio, se toma a partir de los datos del fabricante de los cebadores o se calcula con la siguiente ecuación empírica: Cálculo de T<sub>M</sub> (método de G-C)

Por ejemplo, para la secuencia: ttc ccc ggt ctt gta aac c

N= 19                                    # GC= 10                                    %GC= 52%

$T_m = 2^\circ\text{C} * (A+T) + 4^\circ\text{C} * (G+C) = 2 * (9) + 4 (10) = 58^\circ\text{C}$  corrección  $58-5 = 53^\circ\text{C}$

Nota: Se define T<sub>M</sub> (Temperatura de fusión) como la temperatura a la cual el 50 % de los ácidos nucleicos se mantiene disociado o desnaturalizado

El número de ciclos está limitado por la eficiencia de la polimerasa, estableciéndose un rango de entre 25 a 40 ciclos. Una mayor cantidad de ciclos puede producir bandas fantasmas u otras aberraciones en los productos del PCR. Las variantes en los ciclos son diversas de acuerdo a las condiciones obtenidas en la estandarización. Las principales variaciones son:

Incrementar en uno a dos segundos por ciclo el tiempo de la polimerización, cuando se obtienen barridos o con baja eficiencia.

Variar la pendiente de cambio entre temperaturas, principalmente entre la alineación y polimerización, cuando hay baja eficiencia en la reacción y en la electroforesis se observan los oligos.

Realizar 5 a 6 ciclos iniciales, con 1 a 4 grados arriba de la temperatura de alineación, cuando la reacción es sumamente específica para un fragmento y las falsas alineaciones generan resultados erróneos.

Realizar de 5 a 6 ciclos iniciales, con 1 a 4 grados abajo de la temperatura de alineación, cuando se obtiene baja eficiencia. La polimerización final se realiza a 72 °C por 10 minutos, posteriormente se programa al termociclador en un tiempo de espera a 4 °C y se conservan los productos en refrigerador.

El aceite mineral generalmente no produce problemas en la manipulación de los productos del PCR, no obstante, puede ser necesario eliminarlo. El método más eficiente es utilizar el micropipeteador, otra alternativa es introducir el tubo a -70 °C y una vez solidificada la muestra, se puede retirar fácilmente el aceite por decantación, o deposita el contenido del tubo en un pedazo de parafilm de donde se recoge posteriormente el producto de PCR, los dos últimos métodos involucran un alto riesgo de contaminación.

### Otros cuidados

Considerando la gran sensibilidad de la reacción de PCR, se deben extremar los cuidados en:

Proteger de cualquier fuente de contaminación, tanto a los materiales como a los reactivos.

Trabajar con guantes limpios, la protección pertinente y en una campana de flujo laminar tipo I o II.

Hacer reproducibles todas las variables posibles alrededor de los experimentos.

En la extracción de ADN, se debe eliminar los otros compuestos orgánicos presentes en la muestra (residuos de fluidos orgánicos), así como los residuos de los reactivos utilizados en la reacción (SDS, fenol, cloroformo, alcohol y el exceso de sales).

En un estudio, mantener el mismo paquete de materiales y reactivos, ya que el cambio de uno de ellos puede requerir una nueva estandarización.

De las condiciones químicas, la reacción debe contener al menos lo siguiente:

| Reactivo            | Concentración esperada                               | volumen requerido |
|---------------------|--|-------------------|
| ADN molde           | 15 a 50 nanogramos                                   |                   |
| Cebador RAPD        | 0.1 a 1 micromolar                                   |                   |
| dNTP                | 200 micromolar de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) |                   |
| Taq polimerasa      | 0.2 a 1 unidades                                     |                   |
| Cloruro de Magnesio | 1.5 a 3 molar  |                   |
| Amortiguador        | 1.1 X  |                   |
| Agua ddue           |  |                   |
| Aditivos            | variable   |                   |
| Total               |  | 25 microlitros    |

En un tubo termo transparente se agregan los reactivos necesarios. En el caso de la práctica que realizaremos deberá llevar a un volumen final de 25 microlitros. Posteriormente se homogeneizan los reactivos, se precipitan por centrifugación y en caso de requerirse, se agregan 50 microlitros de aceite mineral para evitar la evaporación durante el experimento. Finalmente, los tubos, debidamente etiquetados se colocan en el termociclador (aparato para controlar las condiciones físicas de la reacción).

Competencia: Valorar diferentes metodologías de la tecnología de ADN a nivel celular para ejemplificar su aplicación, con actitud profesional

Materiales y Equipos

Micropipetas automáticas

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Tejido fresco para la extracción de ADN

Metodología.

## PCR específico

Para los experimentos antes de iniciar la preparación de mezclas, se sugiere determinar el número de muestras que serán analizadas, el volumen de cada reacción individual y preparar una mezcla madre con el total del cebador F, cebador R, dNTPs, magnesio, agua y *Taq* polimerasa. De la mezcla maestra, son separadas las alícuotas individuales a las que se les agrega la muestra a amplificar.

En el ejercicio se utilizarán cebadores universales para la amplificación de un fragmento específico de la región control del ADN mitocondrial, que amplifica la región entre el citocromo b y la terminación del D loop 5-CTTGAAAAACCACCGTTGTTA-30) y (50-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC-30). De 2354 pares de bases.

Prepare la campana de flujo laminar, encendiendo el aire, limpiando el área de trabajo con alcohol y en su caso se enciende la lámpara UV, y se deja funcionar al menos de 15 a 30 minutos. Recuerde que los rayos UV pueden producir daños en los humanos, por lo que no se olvide de apagar la luz ultravioleta, antes de empezar a trabajar.

Para efectuar el ejercicio amplificación se utilizará un cebador universal

En cuanto a las condiciones físicas, consideramos la desnaturalización, alineación y polimerización en treinta ciclos.

Las condiciones para la amplificación son las siguientes.

| Teórico                                  | Usado en practica |
|--|-------------------|
| Desnaturalización inicial 95°C por 2'45" |                   |
| Ciclos 30                                |                   |
| Desnaturalización 94°C por 30"           |                   |
| Alineación 50°C por 30"                  |                   |
| Polimerización 72°C por 30"              |                   |
| Extensión final 72°C por 10 minutos      |                   |

Conservación 6°C Indefinido

Conservación 6°C Indefinido.



De las condiciones químicas, la reacción se realizará con un paquete comercial, por lo que se debe agregar solo lo siguiente:

| Reactivo            | Concentración esperada | volumen requerido |
|---------------------|------------------------|-------------------|
| ADN molde           | 15 a 50 nanogramos     | 1 microlitro      |
| Cebador 1 (forward) | 0.1 a 0.5 micromolar   | 1 microlitro      |
| Cebador 2 (reverse) | 0.1 a 0.5 micromolar   | 1 microlitro      |
| Reactivo comercial  |                        |                   |
| Total               |                        | 25 microlitros    |

En un tubo termo transparente se agregan los reactivos necesarios. En el caso de la práctica que realizaremos deberá llevar a un volumen final de 25 microlitros. Posteriormente se homogeneizan los reactivos, se precipitan por centrifugación y en caso de requerirse, se agregan 50 microlitros de aceite mineral para evitar la evaporación durante el experimento. Finalmente, los tubos, debidamente etiquetados se colocan en el termociclador (aparato para controlar las condiciones físicas de la reacción).

Recomendaciones para plasmar los resultados y su análisis

Describe el trabajo realizado en la campana, analice lo realizado (¿qué reactivos utilizo?, ¿por qué?).

## PRÁCTICA 15 Practica Teórica de secuenciación

### INTRODUCCION:

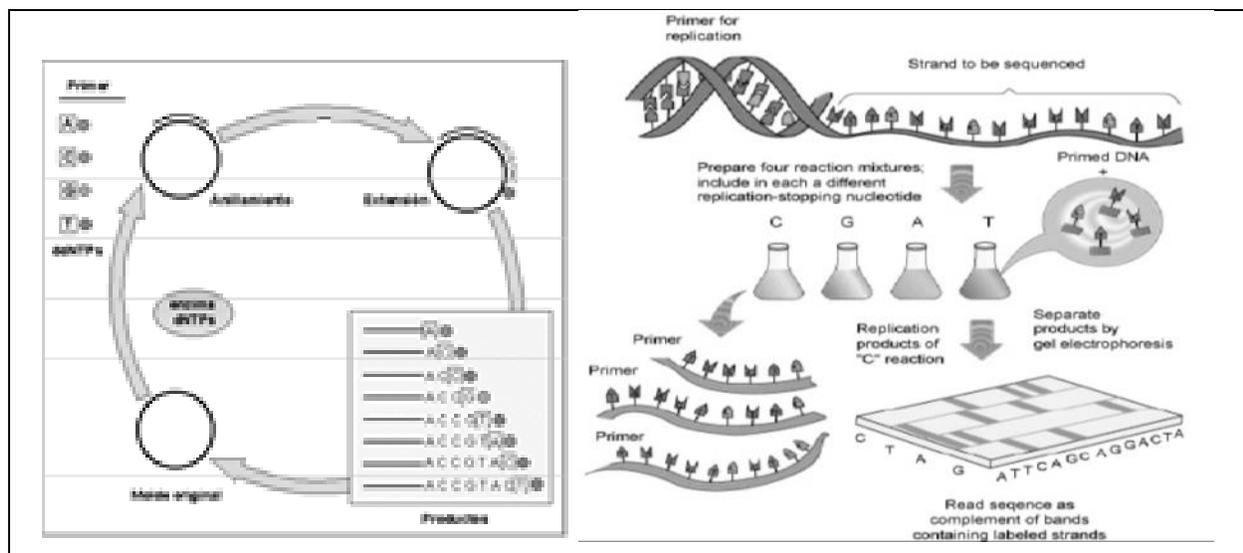
Para la revisión de secuencias de ADN y la exploración de la página WEB del GeneBank se explican los pasos de las metodologías que se utilizarán.

Para el reporte de práctica se recomienda investigar el marco de referencia teórico de la sesión, así como la introducción para el reporte, por parte del estudiante

### Secuenciación

Durante 1977, Frederick Sanger utilizando un método basado en la síntesis enzimática de cadenas de ADN complementarias a la cadena a secuenciar, empleando un método de marcación radioactiva desarrollado por Allan Maxam y Walter Gilbert. Con el método de Sanger a partir de un hilo de un fragmento del genoma se sintetiza al hilo complementario, con cuatro reacciones enzimáticas.

Durante 1977, se podían secuenciar hasta 100 bases por experimento, utilizando marcadores radioactivos y actualmente, existen equipos que pueden secuenciar hasta unos cientos o unos miles de bases. La mayoría de los equipos son para menos de 1000 bases, y utilizan marcadores colorimétricos, de más fácil manejo y que combinan los métodos de PCR.



### Secuenciación Masiva

El acelerado crecimiento tecnológico para el estudio del ADN, brinda diversas herramientas para incrementar la velocidad de secuenciación, así como el desarrollo de estrategias alternas como lo es la pirosecuenciación. Consideremos que los métodos tradicionales de secuenciación permiten analizar en una electroforesis capilar una muestra de entre 100 a 1000 pares de bases, por lo que evaluar un genoma completo implica el análisis de fragmento en fragmento hasta completarlo, lo que implica el consumo de grandes cantidades de materiales y equipos.

Con la pirosecuenciación se puede evaluar todo un genoma en un experimento. La forma que se lleva a cabo es a nanoescala, en donde todo el genoma se fragmenta en hilos individuales de entre 300 y 1000 pares de bases. Cada hilo se polimeriza en una reacción en donde al unirse cada una de las bases se libera dos grupos fosfatos que reaccionan con una enzima emitiendo un brillo que es captado y se

almacena dicha información. La base de datos generada incluye la secuencia de cada uno de los hilos que se analiza, de tal forma que se obtienen millones de secuencias cortas. Posteriormente con paquetería para el análisis masivo de datos, se efectúa el análisis.

Un experimento de pirosecuenciación se puede ensamblar la secuencia completa de un organismo procarionte, que tiene hasta 6,000,000 de pares de bases. La misma técnica tiene otras aplicaciones, entre las que se incluyen diversos análisis metagenómicos, en la cual se pueden analizar e identificar numerosas especies de microorganismos de una muestra. Otras de las aplicaciones incluyen el descubrimiento de secuencias microsátélites o SNP, para especies poco estudiadas.

Competencia: Aplicar técnicas de replicación artificial de ADN para analizar sus fases con actitud crítica y profesional

Materiales y Equipos

¿Qué debe llevar al laboratorio?

Equipo de cómputo

Metodología.

### Secuencias en GENE BANK

El acceso al “Gene Bank” es público, de tal forma que de cualquier equipo se puede ingresar a la siguiente liga:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

El sitio WEB es muy grande, con diversas herramientas y paquetes de información, por lo que se le recomienda explorarlo muy ampliamente.

Para revisar algunas de las secuencias disponibles, en la barra de búsqueda anote el nombre de una especie, por ejemplo, el nombre de la trucha en inglés “trout” o si lo desea su nombre científico *Oncorhynchus mykiss*.

La página que se despliega muestra todos los registros que se tienen en bibliografía (Literature), aspectos relacionados con la salud (Health), genomas (Genomes), genes (Genes), proteínas (Proteins) y aspectos relacionados con la química (Chemicals).

En genomas puede dar clic en botón izquierdo del ratón con el cursor señalando la palabra “Nucleotide”. Al momento que se despliega la nueva página puede visualizar en números en color café, el número de entradas (secuencias) que están registradas.

En letras color azul se indica el nombre de cada una de las entradas, señalando el nombre del gen o de la secuencia específica. Al click con el cursor señalando las letras color azul, aparece el registro correspondiente, con una amplia información relativa a la secuencia.

En cada registro se detalla diversos aspectos, por ejemplo, quien descubrió la secuencia, para que estudio y si este ya se publicó en alguna obra científica. También puede encontrar la traducción de la secuencia a proteínas indicado con el código de una letra:

| Aminoácido      | Código de tres letras | Código de una letra |
|-----------------|-----------------------|---------------------|
| Alanina         | Ala                   | A                   |
| Arginina        | Arg                   | R                   |
| Asparagina      | Asn                   | N                   |
| Ácido aspártico | Asp                   | D                   |
| Cisteína        | Cys                   | C                   |
| Glutamina       | Gln                   | Q                   |
| Ácido glutámico | Glu                   | E                   |
| Glicina         | Gly                   | G                   |
| Histidina       | His                   | H                   |
| Isoleucina      | Ile                   | I                   |
| Leucina         | Leu                   | L                   |
| Lisina          | Lys                   | K                   |
| Metionina       | Met                   | M                   |
| Fenilalanina    | Phe                   | F                   |
| Prolina         | Pro                   | P                   |
| Serina          | Ser                   | S                   |
| Treonina        | Thr                   | T                   |
| Triptófano      | Trp                   | W                   |
| Tirosina        | Tyr                   | Y                   |
| Valina          | Val                   | V                   |

La secuencia esta numerada a partir de la primera base del gen o de la primera base adecuadamente reconocida y validada.

En la misma página, con letras en color azul, en el área central al inicio de la pantalla, podrá encontrar la palabra "Send". Cuando da click, se despliega un menú, en el que señalando alguna de las opciones puede descargar la entrada completa en su computadora. En nuestro caso le recomiendo señale "Complete Record" y en la sección "Choose destination" indique "File". Para descargar elija el formato "Fasta", el cual es reconocido por una amplia diversidad de aplicaciones.

El archivo descargado lo puede abrir con cualquier paquete para leer textos, por ejemplo, con "notepad" y podrá observar que el formato Fasta tiene diversas particularidades. Primero están los identificadores de la entrada en el "Gene Bank" y posteriormente la secuencia completa sin espaciadores, escrita a renglón continuo. Por supuesto, existen diversas aplicaciones que pueden interpretar y analizar la o las secuencias que descargue.

Dentro del sitio del "Gene Bank", en todas sus páginas dentro de la sección de "Nucleotide", se mantiene la barra de búsqueda, por lo que, en cualquier momento puede iniciar una nueva búsqueda o realizarla en forma más específica.

### Blast

La consulta y revisión de secuencias puede realizarse con la estrategia denominada "Blast", con la cual a partir de una secuencia se puede realizar el contraste con todas las que están alojadas en el "Gene Bank".

Como ejemplo descargue una secuencia en formato Fasta y posteriormente abra el archivo con la aplicación "Notepad", posteriormente utilizando los comandos -control-C-, copie exclusivamente la secuencia o una parte de la misma.

En la página del “Gene Bank” ingrese utilizando la liga “BLAST” ubicada al lado derecho de la página principal. Posteriormente en la imagen donde están las palabras “Nucleotide BLAST”, ingrese dando click en el icono.

En el espacio ubicada abajo del texto “Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)”, coloque el cursor y con los comandos –control-v-, pegue la secuencia que había copiado previamente. En la parte inferior de la página se encuentra un botón azul con el texto “BLAST”. Aparecerá una pantalla temporal en lo que se realiza la búsqueda.

En la pantalla aparecerá un gráfico con el encabezado “Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence”. Las líneas rojas representan las primeras secuencias con un alto grado de similitud. Cuando pasa el cursor en cada línea, aparecen caracteres básicos de cada secuencia encontrada. Puede acceder a una mayor información avanzando hacia abajo en la página o dando click con el cursor señalando la línea roja.

En cada secuencia puede encontrar los estadígrafos básicos del análisis y la comparación base por base entre la secuencia que envió y las que encontró el sistema BLAST.

En la cabecera de la pantalla también podrá encontrar otras opciones de análisis, como, por ejemplo: “Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]”.

El Gene Bank tiene una amplia diversidad de herramientas, así como un amplio menú de ayudas. Vale la pena una amplia revisión de los contenidos.

## Preparación de reactivos

### Colorantes

#### Acetocarmín

Carmín -----4-5 g  
Ácido acético-----45 ml  
Agua destilada-----55 ml

Se disuelve el carmín en ácido acético al 45% y la disolución se calienta hasta ebullición, teniendo la precaución de refrigerar continuamente los vapores para no variar la concentración; esto se consigue calentando la mezcla en un Erlenmeyer cerrado mediante un tapón de goma perforado a través del cual se pasa un serpentín de refrigeración. La solución, una vez fría, se filtra.

#### Aceto-Orceína

Orceína.....2 g  
Ácido acético.....45 ml  
Agua.....55 ml

En la preparación de la aceto-orceína se recomienda agregar la orceína a el ácido acético caliente (80° a 90° C) y agitar rápidamente. Posteriormente se añade gradualmente el agua destilada a temperatura ambiente. La mezcla se dejar enfriar y se filtra dos (2) veces. Finalmente se guarda en botella oscura.

#### Azul de metileno

Azul de metileno.....1 g  
Agua destilada.....100 ml

#### Cristal violeta: (tinción Gram)

Cristal violeta (violeta de genciana).....0,5 g  
Agua destilada.....100 ml

#### Eosina

Eosina.....0,3 g  
Ácido acético glacial.....0,025 ml  
Agua destilada.....100 ml

## Hematoxilina

|                     |     |
|---------------------|-----|
| Hematoxilina.....   | 2 g |
| Agua destilada..... | 1 l |

## Lugol: (tinción Gram)

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Yodo.....            | 1 g    |
| Yoduro potásico..... | 2 g    |
| Agua destilada.....  | 300 ml |

## Safranina: (tinción Gram).

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Safranina.....      | 0,25 g |
| Agua destilada..... | 100 m  |

## Reactivos en general

En la preparación de todos los reactivos se recomienda agua destilada y esterilizada.

## Azul de bromofenol.

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Urea.....                | 7 M    |
| EDTA .....               | 0.01 M |
| Sacarosa .....           | 5 gr.  |
| Azul de bromofenol ..... | 0.01gr |
| Aforar a 10 ml.          |        |

## Agarosa 0.8%

|                |         |
|----------------|---------|
| TBE 0.5 X..... | 30 ml   |
| Agar .....     | 0.24 gr |

## Bromuro de etidium

Bromuro de etidium (10 mg/ ml) en base agua

Nota: el bromuro es sumamente mutagénico en bajas concentraciones, por lo que se deben extremar los cuidados en su preparación, utilizando campana de extracción, guantes (de preferencia dobles) y ropa adecuada.

## Proteinasa K

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Proteinasa K.....            | 100 mg |
| Agua.....                    | 5 ml   |
| Guardar en alícuotas a -20 C |        |

## SDS al 20 %

SDS .....100 gr.  
Agua.....375 ml  
Ajustar el pH a 7.2 con HCl y aforar a 500 ml.

## STE (solución de lisis para extracción de ADN)

Tris base- HCl pH 8.0.....10mM  
NaCl.....400 mM; (diversos autores sugieren entre 100 y 400 mM, dependiendo del organismo de donde se pretende extraer ADN)  
EDTA di sódico .....2 mM (Recordar que es un agente castrante del magnesio requerido por las nucleasas, por lo que de ser necesario se puede llevar hasta 200 mM, aunque posteriormente se debe prestar especial cuidado para eliminar el exceso de EDTA, generalmente es requerido entre 1 y 5 mM)

## TBE

La concentración de uso es de 0.5 X

Tris base (FW= 121.14) .....54 g  
Ácido Bórico (FW= 61.83) .....27.5 g  
EDTA 0.5 M (pH 8.0) .....20 mL

AFORAR A 1 Lt

Para preparar EDTA 0.5 M, para 500 mL

Agregue 93.05 g EDTA disódico (FW= 372.2), en aproximadamente 400 mL Agua.ddue, ajuste el pH a 8.0 con NaOH y disuelva.

NOTA IMPORTANTE: para que se disuelva el EDTA primero se debe ajustar el pH, de otra forma no se disolverá.

## TE, pH 8.0

Tris.....10 mM  
EDTA.....1 mM

## TEK, pH 7.5.

Tris Base .....50 mM  
EDTA.....10 mM  
KCl.....1.5%

## TEK- Sacarosa (15%)

TEK.....100 ml

Sacarosa.....15 gr.

## Soluciones para titulación

### Solución A

Solución alcohólica de fenolftaleína al 0.1 %

0.1 g de fenolftaleína se aforan a 100 ml con alcohol isopropílico al 96 %. Se recomienda preparar 25 ml.

### Solución B

Solución de hidróxido de sodio 0.05 N

2.03 g de hidróxido de sodio se aforan a 1000 ml con agua destilada. Se recomienda preparar 100 ml.

## LITERATURA

(La clave se indica para la biblioteca UABC- Campus Ensenada)

- Alberts, B. 2011. Biología molecular de la célula. QH581.2 I5818 2011
- Balbás, P. 2002. De la biología molecular a la biotecnología H 506 B35
- Bonifacino, J. S. 2004. Short protocols in cell biology. QH585.2 S46
- Callen, Jean-Claude. 2000. Biología celular: de las moléculas a los organismos. QH581.2 C3518
- De Robertis, E.M.F. 2004. Biología celular y molecular de De Robertis . QH581.2 D47 2004
- Dieffenbach, C. W. 1995. PCR primer: a laboratory manual. QP606 .D46 P75
- Elliott, W. H. 2002. Bioquímica y biología molecular. QP514.2 E5518
- Fernández Ruiz, B. 2000. Biología celular 1a. QH581.2 B56 2000
- Gerstein, A. S. 2001. Molecular biology problem solver: a laboratory guide. QH506 M65
- González Moran, M. G.1996. Técnicas en biología celular: teoría y práctica. QH585 G65
- Green, Michael R. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. QH442.2 G74 2012 V.1-3
- Hoebel, A. R. (ed) 1998. Molecular Genetic Analysis of Populations. IRL press, Oxford. QH455 M65 1998
- Jiménez García, L. F. 2003. Biología celular y molecular. 1a. QH581.2 B56
- Karp, G. 2011. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos. QH581.2 K3718 2011
- Lodish, H. 2005. Biología celular y molecular, 5a. QH577 B5618
- Malacinski, G. M. 2003. Essentials of molecular biology. QH 506 M35
- Micklos, D. A. 2003. DNA science: a first course 2a. QH 506 M52
- Nelson, David L. 2009. Lehninger principles of biochemistry. QD415 L4418 2009.
- Pérez Campos, Josefina. 2007. Antología de biología celular. QH581.2 B56 2003